

***Streptococcus pyogenes* Serotyp M49 –
Einordnung von Ralp3 in das regulatorische Netzwerk und
Modellerstellung der Plasminogen-vermittelten
Keratinozyten-Invasion**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Nikolai Siemens

aus Rostock

geboren am 23.09.1982

Rostock, November 2011

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Hubert Bahl

Universität Rostock

Institut für Biowissenschaften

Abteilung Mikrobiologie

Albert-Einstein-Str. 3

18051 Rostock

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer

Universität Rostock

Universitätsmedizin Rostock

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Schillingallee 70

18057 Rostock

Tag der Verteidigung: 30.01.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 2 -
1. Einleitung	- 5 -
1.1 Klinische Relevanz von <i>Streptococcus pyogenes</i>	- 5 -
1.2 <i>Streptococcus pyogenes</i> - Taxonomie und Serotypisierung	- 5 -
1.3 Adhäsine, GAS-Adhärenz und Wirtszell-Internalisierung	- 7 -
1.4 Virulenzregulation und ERES-Pathogenitätsinsel	- 9 -
1.5 Zielstellung der Arbeit	- 12 -
2. Material und Methoden	- 14 -
2.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits	- 14 -
2.2 Laborgeräte, Materialien und Software	- 18 -
2.3 Vektoren und rekombinante Plasmide	- 20 -
2.4 Bakterienstämme	- 21 -
2.5 Eukaryote Zelllinien	- 22 -
2.6 Nährmedien und Zellanzucht	- 23 -
2.6.1 Nährmedien	- 23 -
2.6.2 Medienzusätze	- 24 -
2.6.3 Stammhaltung	- 24 -
2.6.4 Zellanzucht	- 24 -
2.6.5 Messung der optischen Dichte	- 25 -
2.7 Molekularbiologische Methoden	- 25 -
2.7.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pyogenes</i>	- 25 -
2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA	- 25 -
2.7.2.1 Plasmid Mini-Präparation aus <i>E. coli</i>	- 25 -
2.7.2.2 Plasmidschnellnachweis aus <i>E. coli</i> mittels „Colony-Fast-Screen“	- 25 -
2.7.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	- 25 -
2.7.4 Enzymatische Modifikation von DNA	- 26 -
2.7.4.1 Restriktion von DNA	- 26 -
2.7.4.2 Ligation	- 26 -
2.7.5 <i>In-vitro</i> Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion	- 27 -
2.7.5.1 Standard-PCR	- 27 -
2.7.5.2 Primerdesign	- 27 -
2.7.6 Fällung von Nukleinsäuren	- 28 -
2.7.6.1 Isopropanolfällung	- 28 -
2.7.6.2 Natriumacetat-Ethanol Fällung	- 28 -
2.7.7 Agarosegelelektrophorese	- 28 -
2.7.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA/DNA	- 29 -
2.8 DNA-Transfer in <i>E. coli</i>	- 29 -
2.8.1 Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	- 29 -
2.8.2 Hitzeschock-Transformation	- 30 -
2.9 DNA-Transfer in <i>S. pyogenes</i>	- 31 -
2.9.1 Herstellung kompetenter <i>S. pyogenes</i> -Zellen	- 31 -
2.9.2 Elektroporation	- 32 -
2.10 Methoden zur Analyse von RNA	- 32 -
2.10.1 Isolierung der RNA aus <i>S. pyogenes</i>	- 32 -
2.10.2 Microarray-Analyse	- 32 -
2.11 Proteinbiochemische Methoden	- 33 -
2.11.1 Zellernte und Zellaufschluss	- 33 -

2.11.1.1 Heterologe Genüberexpression zur Aufreinigung von <i>Strep</i> -Tag-Proteinen	- 33 -
2.11.1.2 Schneller Aufschluss für SDS-PAGE	- 33 -
2.11.1.3 Ribolyser Aufschluss für die Proteinaufreinigung	- 34 -
2.11.2 Aufreinigung von rekombinanten <i>Strep</i> -Tag-Proteinen	- 34 -
2.11.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	- 35 -
2.11.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	- 36 -
2.11.5 Coomassie-Färbung	- 37 -
2.11.6 Transfer von Proteinen auf Membranen	- 37 -
2.11.7 Immunologische Detektion von Proteinen	- 38 -
2.12 Virulenzrelevante Versuche	- 38 -
2.12.1 Adhärenz- und Internalisierungsassay	- 38 -
2.12.2 Bakteriellles Wachstum in Humanmedien	- 39 -
2.12.3 Kapsuläre Hyaluronsäure-Messung	- 40 -
2.12.4 Plasminogen-Bindung an Bakterien	- 41 -
2.12.5 Cysteinproteaseaktivität-Assay	- 41 -
2.13 Transfektion eukaryoter Zellen	- 42 -
2.14 Statistische Analyse	- 42 -
3. Experimente und Ergebnisse	- 43 -
3.1 Die Rolle des RE-Genblocks in der GAS M49 Pathogenese	- 43 -
3.1.1 Die Rolle von Ralp3 in GAS M49 Virulenz	- 43 -
3.1.1.1 Adhärenz an und Internalisierung in humane Keratinozyten	- 43 -
3.1.1.2 Das Überleben von GAS M49 in unterschiedlichen Medien	- 44 -
3.1.1.3 Der Hyaluronsäuregehalt der Kapsel	- 46 -
3.1.1.4 Plasminogenbindung	- 46 -
3.1.1.5 SpeB-Aktivität in den Kulturüberständen von GAS M49	- 47 -
3.1.1.6 Ralp3-Transkriptom	- 48 -
3.1.1.7 Gene mit signifikant veränderten Transkripten in der $\Delta rlp3$ -Deletionsmutante	- 49 -
3.1.1.8 Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen	- 53 -
3.1.2 Heterologe Expression von Ralp3 in <i>S. pyogenes</i> Serotyp M2	- 54 -
3.1.2.1 Nachweis des <i>ralp3</i> -Transkripts in GAS M2:: <i>ralp3</i>	- 54 -
3.1.2.2 Adhärenz an und Internalisierung in humane Epithelzellen	- 55 -
3.1.2.3 Das Überleben von GAS M2 in unterschiedlichen Medien	- 56 -
3.1.3 Funktionale Analysen von Epf	- 57 -
3.1.3.1 Adhärenz an und Internalisierung in humane Epithelzellen	- 57 -
3.1.3.2 Auswahl des Expressionssystems	- 58 -
3.1.3.3 Amplifikation und Klonierung der <i>epf</i> -Fragmente	- 59 -
3.1.3.4 Heterologe Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung der <i>Strep</i> -Tag-markierten rekombinanten Proteine EpfN, EpfDUF1-4 und EpfDUF1-16	- 60 -
3.1.3.5 Nachweis von Epf als bakterielles Adhäsın	- 62 -
3.2 Die Rolle von Plasminogen in der GAS M49 Virulenz	- 65 -
3.2.1 Plasminogenbindung von GAS	- 65 -
3.2.2 Oberflächen-gebundenes Plasminogen verstärkt GAS M49 Adhärenz und Internalisierung	- 66 -
3.2.3 Inhibition der Plasminogen-vermittelten Adhärenz und Internalisierung durch Heparin-	- 67 -
3.2.4 Integrin-Plasminogen vermittelte Invasion	- 68 -
3.2.5 Reduktion der Plasminogen-vermittelten Internalisierung durch genetischen Knock-down von ILK	- 69 -
3.2.6 Einfluss des ILK-Signalweges auf die Plasminogen-vermittelte Invasion	- 70 -
3.2.7 Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die GAS M49 Invasion	- 72 -
3.2.8 Überlebensrate der Bakterien in Blut und Makrophagen	- 73 -
4. Diskussion	- 74 -
4.1. Einordnung von Ralp3 in das Virulenz-assoziierte regulatorische Netzwerk von <i>S. pyogenes</i> M49	- 74 -
4.2 Plasminogen-vermittelte GAS M49-Invasion der Keratinocyten	- 81 -
6. Anhang	- 88 -

6.1	Abkürzungsverzeichnis	- 88 -
6.2	Literaturverzeichnis	- 92 -
6.3	Abbildungen	- 102 -
6.4	Tabellen	- 103 -

1. Einleitung

1.1 Klinische Relevanz von *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes ist ein ausschließlich humanpathogener, weltweit verbreiteter Erreger. Die genaue Zahl der durch Streptokokken verursachten Erkrankungen pro Jahr ist unbekannt. Schätzwerte gehen jedoch von jährlich 663.000 neuen Fällen schwer verlaufender Streptokokkeninfektionen mit mindestens 163.000 Todesfällen aus (Carapetis et al., 2005). Typische Kolonisationsorte bei Infektionen des Menschen sind Haut und Rachen. Zumeist verursacht das Bakterium lokale, eitrige, nicht-invasive Infekte wie Pharyngitis, Tonsillitis, Impetigo oder Erysipel. Bei Infektionen mit bestimmten Serotypen und häufiger auch in Patienten mit prädisponierenden Grunderkrankungen kommt es in seltenen Fällen zu generalisierten Infektionen von Geweben mit anschließender nekrotisierender Faszitis oder Sepsis (Cunningham, 2000).

Generell werden die Infektionen des Menschen mit *S. pyogenes* in drei verschiedene Verlaufsformen eingeteilt (Podbielski and Kreikemeyer, 2004):

1. Lokale, Oberflächen-assoziierte Infektionen auf der Haut und Schleimhaut wie Impetigo, Pharyngitis oder Tonsillitis.
2. Systemisch invasive Infektionen wie nekrotisierende Faszitis, Scharlach oder Streptococcal-Toxic-Shock-Syndrom (STSS).
3. Asymptomatische Besiedlung in Verbindung mit rezidivierenden lokalen oder systemischen Infektionen.

Unabhängig von einer Antibiotikatherapie kann die asymptomatische Besiedlung als Folge einer lokalen Infektion eintreten (Adam et al., 2000; Markowitz et al., 1993; Pichichero et al., 1999; Podbielski and Kreikemeyer, 2001).

1.2 *Streptococcus pyogenes* - Taxonomie und Serotypisierung

Eine 1933 veröffentlichte Arbeit von R. Lancefield beschrieb erstmals die serologische Einteilung der hämolysierenden Streptokokken in unterschiedliche Gruppen. 23 von 106 getesteten Stämmen, die ausschließlich aus dem Menschen isoliert wurden, konnten aufgrund des für sie spezifischen Polysaccharid-Antigens in der Zellwand der Gruppe „A“ zugeordnet und daher als Gruppe A *Streptococcus* (GAS) bezeichnet werden (Lancefield, 1933). GAS, oder auch *Streptococcus pyogenes*, ist ein Gram-positives, unbewegliches, nicht zur Sporulation befähigtes und Katalase-negatives Bakterium. Es ist kettenförmig oder

paarweise angeordnet. Taxonomisch zählt *S. pyogenes* zur Gattung *Streptococcus* sowie der Familie *Streptococcaceae*. Aufgrund seiner Fähigkeit des ausschließlich fermentativen Zuckerabbaus unter Bildung von Laktat gehört *S. pyogenes* zur Ordnung der *Lactobacilliales* (Patterson, 1996). Abbildung 1.1 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *S. pyogenes*.

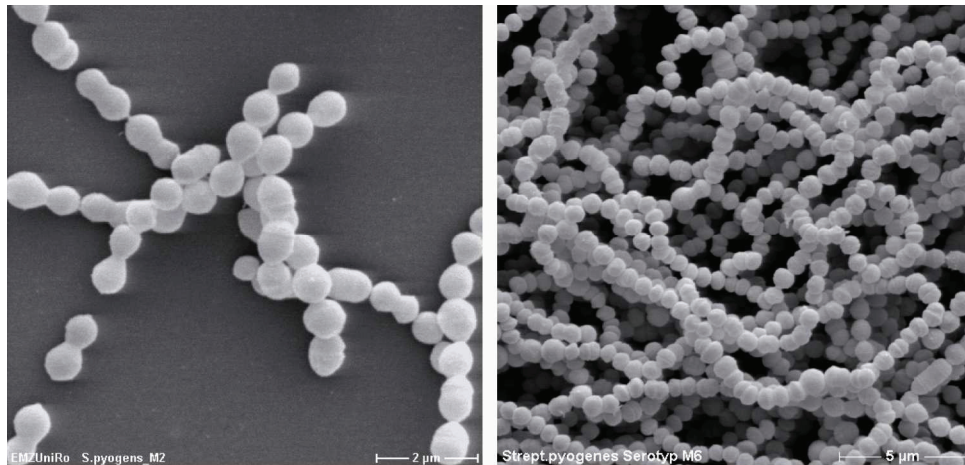


Abbildung 1.1: Rasterelektronische Aufnahme von *S. pyogenes* Serotyp M2 (links) und Serotyp M6 (rechts). (Quelle: Lembke, 2009).

Eine geordnete Klassifizierung der Streptokokken, basierend auf der Produktion unterschiedlicher Hämolsine, wurde erstmalig von Schottmüller im Jahre 1903 (Williams et al., 1932) vorgenommen. Darauf aufbauend teilte Brown (1919) die Streptokokken nach ihrer Fähigkeit, rote Blutkörperchen zu lysieren, in drei Klassen ein.

1. Die α -Hämolysen führt zu grünlich verfärbten Höfen um die Bakterienkolonien. Die so genannte „Vergrünung“ ist auf die Umwandlung des im Blutagar vorliegenden Hämoglobins in Sulfhämoglobin und Methämoglobin zurückzuführen.
2. Die β -Hämolysen führt zu klaren Zonen um die Bakterienkolonien. Durch diesen Vorgang werden die im Agar vorliegenden Erythrozyten vollständig lysiert und das freiwerdende Hämoglobin abgebaut.
3. Die γ -Hämolysen ist dadurch gekennzeichnet, dass das Streptokokken-Wachstum zu keiner morphologischen Veränderung des Blutagars führt.

S. pyogenes wird auf Grund seines Hämolysenverhaltens in die Klasse der β -hämolysierenden Streptokokken eingeordnet und ist demnach in der Lage, Erythrozyten mit Hilfe der extrazellulären Toxine Streptolysin O (sauerstofflabil) und S (sauerstoffstabil) vollständig zu lysieren.

Für die epidemiologische Differenzierung können *S. pyogenes*-Isolate mit weiteren Methoden typisiert werden. Dazu gehört die ebenfalls von Lancefield eingeführte serologische Typisierung nach dem M-Protein (Lancefield, 1928). Hierbei handelt es sich um

ein Zellwandprotein, das von praktisch allen GAS-Stämmen exprimiert wird. Die antiphagozytäre Wirkung des M-Proteins macht es zu einem sehr wichtigen GAS-Virulenzfaktor (Lancefield, 1962). Die Typisierung basiert auf den hypervariablen Sequenzabschnitten im N-terminalen Bereich des M-Proteins. Bisher konnten mindestens 80 serologisch unterscheidbare M-Typen nachgewiesen werden (Facklam and Elliott, 1995). Bei ca. der Hälfte aller GAS-Isolate ist die Immunogenität des M-Proteins für eine sichere serologische M-Typisierung zu gering. Daher werden zusätzlich molekularbiologische Methoden wie die Sequenzierung desjenigen Bereiches des *emm*-Gens, der den N-Terminus des M-Proteins kodiert, oder *emm*-Typ-spezifische PCRs eingesetzt. Mit dieser molekularbiologischen Typisierung lassen sich 150 GAS M-Serotypen unterscheiden (Beall et al., 1996; Kauffhold et al., 1994; Podbielski et al., 1991; Podbielski et al., 1992).

Zusätzlich zur M-Typisierung besteht die Möglichkeit der serologischen Differenzierung auf der Basis eines weiteren Zellwandproteins, dem T-Antigen. T-Antigene sind Pili-Proteine (Mora et al., 2005; Nakata et al., 2009b). Zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 25 T-Antigene bekannt. Ein einzelnes T-Antigen kann mit mehreren M-Typen assoziiert sein.

Eine weitere Möglichkeit GAS zu typisieren ist die Einteilung der GAS in SOF-positive und SOF-negative Isolate (Top, Jr. and Wannamaker, 1968a; Top, Jr. and Wannamaker, 1968b). Diese Typisierung beruht auf der Expression des Serumopazitätsfaktors, einer Proteinase, welche die Freisetzung von Fettsäuren aus Fetttransport-Komponenten in Säugetierseren und in der Folge die Ausfällung (Opazität) von unlöslichen Fettsäuresalzen bewirkt (Kreikemeyer et al., 1999a; Saravani and Martin, 1990; Serrano et al., 1996).

1.3 Adhäsine, GAS-Adhärenz und Wirtszell-Internalisierung

S. pyogenes ist fähig spezifisch an eukaryote Zielzellen zu adhären, in diese zu internalisieren und dort für einen längeren Zeitraum zu überdauern (Courtney et al., 2002a; Kreikemeyer et al., 2004b; Molinari and Chhatwal, 1999; Podbielski and Kreikemeyer, 2001). Innerhalb der Wirtszelle liegen die Streptokokken entweder im nicht-aktivierten Phagolysosom vor oder befinden sich im Zytoplasma. So können sie über mehrere Tage, Wochen oder auch Monate ohne Einschränkung ihrer Vitalität persistieren (Cleary and Cue, 2000). Diese beschriebene Fähigkeit von GAS ist mit der Expression zahlreicher indirekt oder direkt an Wirtszellen wirkender sezernierter und/oder oberflächenlokalisierter Virulenzfaktoren assoziiert. Entsprechend ihrer Funktion werden die Virulenzfaktoren in Adhäsine/Invasine, Aggressine und Immunmoduline eingeteilt. Ihr Vorkommen und ihre Expression sind GAS-Serotyp-spezifisch. Eine detaillierte Übersicht über die GAS-

Virulenzfaktoren liefert die Arbeit von Cunningham (Cunningham, 2000). Nur eine Auswahl der wichtigsten Adhäsine soll im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Die Produktion von Adhäsinen ist die Voraussetzung für die erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes und gegebenen Falls die anschließende Invasion oder Internalisierung. Die Expression der Adhäsine wird durch wechselnde Umwelteinflüsse, Wachstumsbedingungen oder durch die Gegenwart humaner Zielstrukturen ausgelöst und reguliert (Courtney et al., 2002a; Kreikemeyer et al., 2004b).

Die Mehrzahl der bekannten Adhäsine sind Oberflächenproteine. Ihr Vorkommen und ihre Expression sind GAS-Serotyp-spezifisch. Auf Grund vieler struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten werden die meisten GAS-Adhäsine der Proteinfamilie der MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) zugeordnet. Sie binden wirtseigene Matrixproteine, wie z. B. Fibronectin, Fibrinogen und Kollagene (Patti et al., 1994).

Fibronectin-bindende Proteine, wie Protein F1 (Sfbl; streptococcal fibronectin binding protein 1; (Hanski and Caparon, 1992; Talay et al., 1992)) oder Protein F2 (PrtF2; (Kreikemeyer et al., 2004d)) ermöglichen *S. pyogenes* den initialen Kontakt mit den Epithelzellen (Cue and Cleary, 1998b; Greco et al., 1995; Jadoun et al., 1998; LaPenta et al., 1994; Molinari et al., 1997). Die daraus resultierende Fibronectin-vermittelte Internalisierung in die eukaryoten Zellen ist abhängig von wirtseigenen, intrazellulären Enzymen, wie z.B. Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Integrin-linked-Kinase (ILK; (Wang et al., 2006; Wang et al., 2007)). ILK ist eine Serin-Threonin-Kinase, die mit zytoplasmatischen Domänen der β -Integrine interagiert. Damit ist ILK ein zentrales Molekül des Fibronectin-Integrin-vermittelten Austausches der Zelle mit der Umwelt. Zusätzlich ist ILK für die Neuordnung des Zytoskeletts verantwortlich (Hannigan et al., 1996; Persad and Dedhar, 2003b).

Abgesehen von Matrixproteinen können GAS auch zahlreiche Plasmaproteine binden. Ein wichtiger Vertreter ist Plasminogen. Plasminogen ist ein Glycoprotein, welches im Blutplasma vorkommt (Dano et al., 1985a). Es ist die Vorstufe von enzymatisch aktiven Plasmin und wird durch Spaltung des Moleküls zwischen Arg⁵⁶⁰ und Val⁵⁶¹ aktiviert. Die Spaltung wird einerseits durch eukaryote Aktivatoren, wie Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) und Tissue-Plasminogen-Aktivator (tPA), andererseits bei einer Infektion mit GAS durch Streptokinase (Ska) erreicht. Die aktive Serin-Protease Plasmin kann u.a. Strukturen des Bindegewebes, extrazelluläre Matrix (ECM) und Thrombosen auflösen (Dano et al., 1985a; Walker et al., 2005). Mit seinen fünf Kringle-Domänen kann Plasminogen mit unterschiedlichen Liganden eine Bindung eingehen (Ponting et al., 1992a).

Adhäsine, die Plasminogen binden können, werden von Gruppe A, C und G Streptokokken exprimiert (Lahteenmaki et al., 2001). GAS können Plasminogen entweder direkt, über spezifische Adhäsine, oder indirekt binden. Die indirekte Bindung erfolgt erst über die

Interaktion mit Fibrinogen, der Vorstufe von Fibronectin, und anschließender Bindung der Plasminogenmoleküle (Lottenberg et al., 1992a). Die direkte Bindung erfolgt über Oberflächen-assoziierte Proteine. Das sind Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; (Broder et al., 1991; Pancholi and Fischetti, 1992); SDH (Jin et al., 2005)), Enolase (SEN; streptococcal e nolase; (Pancholi and Fischetti, 1998)), PAM (plasminogen-binding group A streptococcal M protein; (Berge and Sjobring, 1993)) und Prp (PAM-related protein; (Sanderson-Smith et al., 2007)). Des Weiteren können GAS ein nephritogenes Protein, das Plasminogen bindet, sekretieren (Poon-King et al., 1993). Die Tatsache, dass eine enorme Zahl an Oberflächen-assoziierten GAS-Proteinen Plasminogen bindet, deutet darauf hin, dass Plasminogen in der GAS-Pathogenese eine wichtige Rolle spielt. Pancholi und Kollegen zeigten in einer Publikation von 2003, dass die Bindung von Plasminogen die Adhärenz der Streptokokken an laryngeale Detroit-Zellen signifikant verstärkt (Pancholi et al., 2003). Jedoch wurden die Internalisierungsmechanismen nicht weiter untersucht.

1.4 Virulenzregulation und ERES-Pathogenitätsinsel

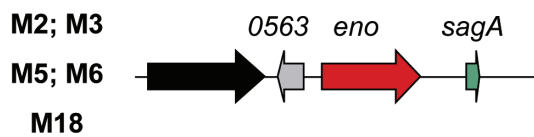
Um die initiale Adhäsion an eukaryote Zielstrukturen und die damit verbundene Kolonialisierung des Wirtes zu gewährleisten, bedürfen die Gruppe A Streptokokken einer streng kontrollierten, variablen und gleichzeitig exakt koordinierten Expressionsregulation von Virulenzfaktoren. Humanpathogene Bakterien wie *S. pyogenes* müssen für eine erfolgreiche Pathogenese mit adaptiven Leistungen gezielt auf Umgebungseinflüsse reagieren können. Die Genregulation wird durch einzelständige Transkriptionsregulatoren (stand-alone-Regulatoren) und Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme erzielt (Parkinson and Kofoed, 1992). Für mehrere von *S. pyogenes* exprimierte Zwei-Komponenten-Systeme und einzelständige Transkriptionsregulatoren wurde bereits eine Beteiligung an Wirt-Pathogen-Interaktionen nachgewiesen (Kreikemeyer et al., 2001; Musser and DeLeo, 2005; Sitkiewicz and Musser, 2006). Eine gute Übersicht liefert die Arbeit von Kreikemeyer (Kreikemeyer et al., 2003b). Die am längsten bekannten und bisher am besten untersuchten stand-alone-Regulatoren sind die globalen Positivregulatoren Mga (multiple gene regulator of GAS) und RofA (regulator of fibronectin binding protein in GAS). Sie sind mit assoziierten Virulenzgenen in distinkten genomischen Regionen organisiert.

Mga ist ein wichtiger Faktor der Virulenzkontrolle im exponentiellen Wachstum von *S. pyogenes*. Er kodiert gemeinsam mit Virulenzgenen, wie z. B. den Genen für M-Protein (*emm*) und C5-Peptidase (*scpA*), im Mga-Locus (McIver et al., 1995). Die Expression von Mga ist autoreguliert und wirkt direkt und indirekt positiv auf mehrere Virulenzgene (Ribardo and McIver, 2006). Von besonderem Interesse ist die Interaktion mit den Regulatoren der RALP-Familie (RofA like proteins).

Ralp-Regulatoren wurden in vier verschiedenen Formen beschrieben. RofA, auch Ralp1 genannt, und Nra (negative regulator of group A streptococci; Ralp2) sind Regulatoren der FCT-Region (fibronectin-/collagen-binding T-Antigen-region) und kommen Serotyp-spezifisch vor (Bessen and Kalia, 2002; Fogg and Caparon, 1997; Kreikemeyer et al., 2004d; Podbielski et al., 1999). Die FCT-Region ist ebenfalls ein distinkter genomischer Locus und kodiert für eine Reihe Virulenzfaktoren, wie z.B. *sfbI*, *prtF2* und *cpa* (collagen-binding protein of group A streptococci; (Kreikemeyer et al., 1999a; Kreikemeyer et al., 2004d; Podbielski et al., 1999)). Globale, genomweite Transkriptomanalysen im Nra-kodierenden FCT-3 Serotyp GAS M49 ergaben, dass Nra an der Regulation eines weiteren Regulators beteiligt ist, der ebenfalls der RALP-Familie zugeordnet werden konnte. Dieser wurde als Ralp3 (RofA like protein type regulator 3) bezeichnet (Kreikemeyer et al., 2007b) und ist ein weiteres Mitglied des regulatorischen Netzwerkes in *S. pyogenes* M49.

In silico-Analysen sagten die Präsenz von *ralp3*-homologen Genen in den Serotypen M1, M4, M12, M28 und M49 voraus. In diesen Serotypen ist der putative Transkriptionsregulator Ralp3 mit den drei Virulenzfaktor-kodierenden Genen *epf*, *eno* und *sagA* assoziiert. Das Gen *eno* kodiert für das Oberflächen-assoziierte Enzym Enolase und ist gleichzeitig ein Plasminogen-bindendes Protein (Kolberg et al., 2006). Streptolysin S, das für die β -Hämolyse verantwortlich ist, wird durch *sagA* kodiert und der extrazelluläre Virulenzfaktor Epf durch *epf*. Die Gene *eno* und *sagA* bilden den sogenannten ES-Genblock, der in allen Serotypen vorkommt (Kreikemeyer et al., 2007b). Ausschließlich in den Serotypen M1, M4, M12, M28 und M49 ist der aus *ralp3* und *epf* bestehende RE-Genblock in die Mitte des ES-Genblocks integriert und komplettiert die ERES-Region. Zusätzlich zum RE-Genblock enthält die ERES-Region dieser Serotypen zwei offene Leseraster, *spy0566* und *spy0567* die Homologien zu Transposasen aufweisen (Kreikemeyer et al., 2007b). Auf Grund des Vorhandenseins solcher Transposase-Genfragmente, der Organisation der ERES-Region, des signifikant erhöhten GC-Gehaltes und der Abwesenheit des RE-Genblocks in einigen Serotypen, stellt die ERES-Region, so wie die FCT-Region, eine mögliche Pathogenitätsinsel dar (Hacker et al., 1997). In der Abbildung 1.2 ist die ES-/ERES-Region dargestellt.

ES-Region



ERES-Region

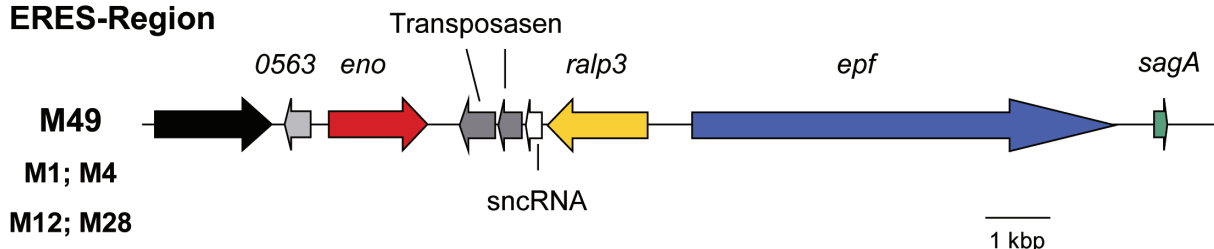


Abbildung 1.2: ES/ERES-Region verschiedener GAS Serotypen ((Kreikemeyer et al., 2007b), mod.). *0563*, offener Leserahmen unbekannter Funktion; *eno*, Enolase; *sagA*, Streptolysin S Precursor; *ralp3*, RofA like protein type regulator 3; *epf*, extrazellulärer Proteinfaktor.

Neben Ralp3 ist in der ERES-Region zusätzlich das extrazellulär lokalisierte Protein Epf kodiert. Das von Serotyp M49 synthetisierte Epf hat eine Masse von etwa 207 kDa (Kreikemeyer et al., 2007b). Die Aminosäuresequenz dieses Proteins ist zu 13 % identisch mit dem Epf-Protein aus *Streptococcus suis*, einem Pathogen für Schweine, welches aber auch Zoonosen beim Menschen verursachen kann (Smith et al., 1993; Vecht et al., 1991). Vergleichende *in silico* Analysen der Epf-Proteine aus den Serotypen M1, M4, M12, M28 und M49 von *S. pyogenes* ergaben signifikante Größenunterschiede. Gemeinsam haben alle ein Signalpeptid im N-terminalen (AS 1-34) und ein LPXTG-ähnliches Motiv im C-terminalen Bereich. Profilanalysen der Aminosäuresequenz aus M49 ergaben für den Bereich AS 387-1841 16 Repeats. Diese repetitiven Aminosäuresequenzen repräsentieren Domänen unbekannter Funktion (DUF1542). Auf Grund unterschiedlicher Anzahlen an DUF1542 (Pfam accession no: PF00746) haben die Epf-Proteine aus verschiedenen Serotypen unterschiedliche Größen. Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Domänenstruktur des Epf-Proteins aus M49.

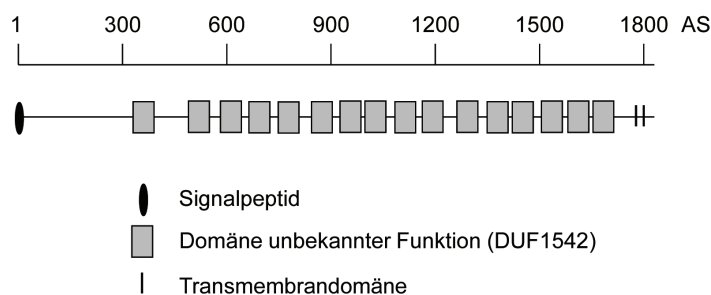


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung von Epf aus *Streptococcus pyogenes* Serotyp M49.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Es ist bereits bekannt, dass Ralp3 innerhalb der ERES-Region die Transkription von *epf* positiv und die von *sagA* negativ beeinflusst. Nra, das die FCT-Region reguliert, ist negativ autoreguliert und reprimiert die Transkription der Gene *cpa* und *prtF2* (Kreikemeyer et al., 2007b). Mga, Regulator des Mga-Locus, ist positiv autoreguliert und hat einen positiven Einfluss auf die Transkription der Gene *fcrA*, *emm*, *enn* und *scpA*, die im Mga-Locus lokalisiert sind (McIver et al., 1995). Jedoch wurden auch gegenseitige Einflüsse zwischen Nra-Ralp3 und Nra-Mga nachgewiesen. Während Nra die Transkription von Ralp3 und Mga reprimiert, haben sowohl Mga als auch Ralp3 einen positiven Einfluss auf Nra-Transkription (Kreikemeyer et al., 2007b). Die Regulationsmuster sind in der Abbildung 1.4 schematisch zusammengefasst. Eine gute Übersicht über das GAS-Transkriptom unter unterschiedlichen Bedingungen liefert die Arbeit von Fiedler et al. (Fiedler et al., 2010b).

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, den Einfluss von Ralp3 auf die Virulenz-relevanten Merkmale des *S. pyogenes* Serotyps M49 zu untersuchen, die Ergebnisse mittels globaler Transkriptomanalysen zu überprüfen und Ralp3 in das regulatorische Netzwerk von *S. pyogenes* einzuordnen. Zusätzlich wurde die Fähigkeit von Epf an humane Zielstrukturen zu adhären untersucht.

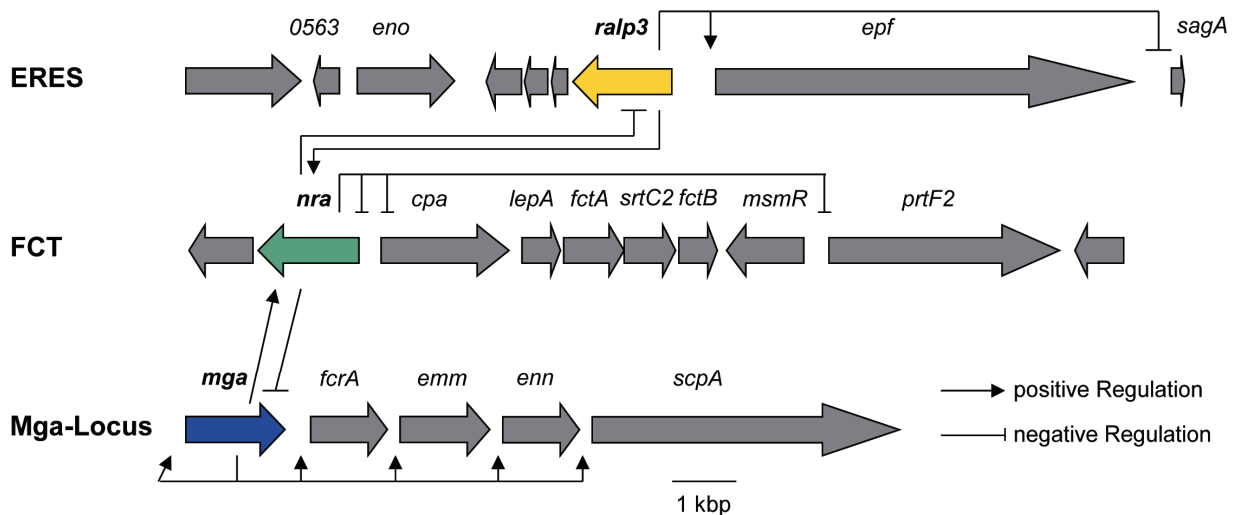


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Ralp3-Nra-Mga regulatorischen Netzwerks in GAS M49 ((Kreikemeyer et al., 2007b), mod.). *0563*, offener Leserahmen unbekannter Funktion; *eno*, Enolase; *ralp3*, RofA like protein type regulator 3; *epf*, extrazellulärer Proteinfaktor; *sagA*, Streptolysin S Precursor; *nra*, negative regulator of group A streptococci; *cpa*, collagen-binding protein of group A streptococci; *lepA*, Signalpeptidase I; *fctA*, Pilus-Protein A; *srtC2*, Sortase C2, *fctB*, Pilus-Protein B, *msmR*, multiple sugar metabolism regulator; *prtF2*, Protein F2; *mga*, multiple gene regulator of GAS; *fcrA*, Immunglobulin Fc-Rezeptor; *emm*, M-Protein; *enn*, EnnX-Protein; *scpA*, C5A-Peptidase.

In der Adhärenz der Bakterien an humane Zellen spielen wirtseigene Proteine eine entscheidende Rolle. Plasminogen, ein Glykoprotein welches im Plasma vorkommt, wird von mehreren Oberflächen-assoziierten Proteinen der Streptokokken gebunden. Einige Publikationen belegen, dass Plasminogen den Bakterien eine verstärkte Adhärenz an humane Epithelzellen ermöglicht (Pancholi et al., 2003; Pancholi and Fischetti, 1998). Wie jedoch die initialen Kontakte zustande kommen und wie die anschließende Internalisierung der Bakterien abläuft, wurde bisher nicht untersucht. Ziel war es, die Rezeptoren der Wirtszellen zu identifizieren und die der Internalisierung zu Grunde liegenden Signalwege innerhalb der Epithelzellen zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits

In der Tabelle 2.1 sind die Enzyme und Chemikalien aufgelistet, die zur Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet wurden.

Tabelle 2.1: Chemikalien und Enzyme

Chemikalie/ Enzym	Hersteller
Acrylamid-Bis (Fertiglösung 40 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Agar (Agar technical No. 3)	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Akt1/2 kinase inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anhydrotetracyclin (AHT)	IBA GmbH, Göttingen
Aprotinin bovine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BamHI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Beta-Mercaptoethanol	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Bradford Reagenz	Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
Brain-Heart-Infusion (BHI)	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Bromphenolblau Natrium-Salz	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	J.T.Baker, Deventer, Holland
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck KGaA, Darmstadt
Cy3 dCTP	GE Healthcare, München
Cy5 dCTP	GE Healthcare, München
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-Desthiobiotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-Val-Leu-Lys 4-nitroanilide dihydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
E-64	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EcoRI (2.500 U)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Erythromycin	Serva, Heidelberg
Essigsäure	J.T.Baker, Deventer, Holland

Ethanol (absolut)	Zentralapotheke des Klinikums, Universität Rostock
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Triplex III)	Merck KGaA, Darmstadt
Glu-Plasminogen	Chromogenix, Italien
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin (99 %)	Merck KGaA, Darmstadt
HABA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Harnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Human integrin $\alpha_1\beta_1$ Triton X-100 formulation purified protein	Millipore, Billerica, MA, USA
Human integrin $\alpha_5\beta_1$ Triton X-100 formulation purified protein	Millipore, Billerica, MA, USA
Human integrin $\alpha_v\beta_5$ Triton X-100 formulation purified protein	Millipore, Billerica, MA, USA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Zentralapotheke des Klinikums, Universität Rostock
Kaliumphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin A, Monosulfat aus <i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Latrunculin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LB Broth Base	Invitrogen, Paisley, Schottland
LY-294,002 hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lys-Plasminogen	Haemtech, Vermont, USA
Lysozym, Muramidase aus Hühnereiweiß	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Holland
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Mutanolysin aus <i>S. globisporus</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat x H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilide hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenol (Roti®- Phenol)	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Phosphorsäure	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Phusion Taq Polymerase	Finnzymes, Hess. Oldendorf
Plasmin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PNGase F (15000 Units)	NEB, MA, USA
PstI (2.500 U)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt
RNase from bovine pancreas	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sall (2.500 U)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
SignalSilence® Control siRNA (Fluorescein Conjugate)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
SignalSilence® ILK1 siRNA (Human Specific)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Spectinomycin Dihydrochlorid x 5 H ₂ O	MP Biomedicals, LLC, Eschwege
<i>Strep</i> -Tactin-Sepharose	IBA GmbH, Göttingen
Sucrose	Serva, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
Todd-Hewitt Broth-Fertignährmedium	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
TransPass™ R2 Transfection Reagent	NEB, MA, USA
Tris (Trizma® Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-Hydrochlorid (Pufferan®)	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Tween® 20	Serva, Heidelberg
Wortmannin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
XhoI (2.500 U)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Die für die Detektion von auf Membranen transferierten Proteinen genutzten Antikörper sind in Tabelle 2.2 aufgezeigt.

Tabelle 2.2: Antikörper

Antikörper/Substrat	Hersteller
<i>Strep</i> -Tactin AP-conjugate	IBA GmbH, Göttingen
BCIP/NBT- <i>Blue Liquid Substrate</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PI3 Kinase Class III (D4E2) XP™ Rabbit mAB	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Phospho-Akt (Ser473) Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-rabbit IgG, AP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
GAPDH (14C10) Rabbit mAB	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
α 2-Antiplasmin (SERPINF2) Peptid	antikoerper-online.de, Aachen
Akt Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Monoclonal Anti-PLG antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ILK1 (4G9) Rabbit mAB	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

Die zur Bearbeitung von Nukleinsäuren verwendeten Kits sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Nukleinsäure-Kits

Kit	Hersteller
QIAprep Spin® Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
„Colony-Fast-Screen“ System	Biozym, Oldendorf
SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Darmstadt
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	QIAGEN, Hilden
Fast RNA Blue Kit	MP Biomedicals, Frankreich

2.2 Laborgeräte, Materialien und Software

Tabelle 2.4: Laborgeräte und Materialien

Laborgerät/Material	Hersteller
24 Well Cell Culture Plates	Greiner, Frickenhausen
Agarosegelelektrophoresekammern	Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
Anaerocult®-Gefäße	Merck KGaA, Darmstadt
Analysenwaage Typ BP 4100S	Sartorius, Göttingen
Biofuge pico	Heraeus, Hamburg
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hamburg
Brutschrank Typ B6060	Heraeus, Hamburg
Coverslips	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Deckgläser (12 mm Ø)	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Elektroporationsküvetten (2 mm-Gap)	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Eppendorfgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop BZ 8.000	Keyence, Neu-Isenburg
Geldokumentation	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gefrierschrank -80 °C Typ Hera freeze	Heraeus, Hamburg
GENbox anaer System	Biomérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Glasperlen	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Heizblock Typ Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Immun-Blot PVDF Membrane (0,2 µm)	Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
Impfösen	Greiner, Darmstadt
Inkubationsschüttler Typ 3031	GFL, Wunstorf
Inkubationsschüttler Typ KTM 100RP	HLC, Bovenden
Inkubator, wasserummantelt, geregelte CO ₂ -Atmosphäre	Heraeus, Hamburg
Kühlzentrifuge Typ 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Latex beads, amine-modified polystyrene, fluorescent yellow-green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Microbank™-System	Pro-Lab Diagnostics, Neston, England
Mikroliterspritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Mini-Vakuum-Pumpe Typ E1	Axon Lab AG, Baden-Dättwil
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
pH-Meter Typ MP 220	Denver Instrument GmbH, Göttingen
Picodrop Microlitre Spectrophotometer	Biozym, Oldendorf
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Greiner, Darmstadt
Pipettierhilfe „Easypet“	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen (10, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Ribolyser	Hybaid, Teddington, England
Ribolyser Tubes	Hybaid, Teddington, England
SDS-Gelkammern	Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
Semi-Dry Transfer Cell Typ Trans-Blot® SD	Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
Sorvall RC5C Plus Zentrifuge (Dupont) mit SS34-Rotor	Sorvall Dtl. GmbH, Bad Homburg
Spannungsgeräte, Power Pac 3000	Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
SpeedVac Concentrator, DNA 120-230	ThermoElectron Corporation, Milford, USA
Spektrophotometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
Standard-Wipptisch Typ WT15	Biometra, Göttingen
Sterilbank Typ antair BSK	Telstar, USA
Sterilbank Arone Typ FC-640	Safelab Systems LTD, England
Sterifix, Injektionsfilter (0,2 µm)	Braun, Melsungen
<i>Strep-Tactin® Superflow</i> Säulen	IBA GmbH, Göttingen
Thermocycler (PCR) Typ T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät UP2005 mit Sonotrode S3	Hielscher Ultrasonic GmbH, Teltow
UV-Kammer, GS Gene Linker	Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
UV-Küvetten (10/2 mm, 220-1600nm)	Eppendorf, Hamburg
UVpette	Eppendorf, Hamburg
UVpetteTips für Picodrop	Biozym, Oldendorf
Vortex-Genie Touch Mixer	Scientific Industries, Bohemia, USA

Whatman Chromatografiepapier
Zentrifuge Varifuge 3.OR

Bio-Rad-Laboratorien GmbH, München
Heraeus, Hamburg

Zur elektronischen Datenverarbeitung wurde folgende Software verwendet:

- BZ observation application Software (Keyence, Neu-Isenburg)
- Geldokumentation Intas GDS Application Software (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen)
- Microsoft Office Programme (Word, Excel, PowerPoint; Microsoft, Redmond, USA)
- Nucleotide Analysis Tools, Reverse Complement (Institute of Transfusion Medicine and Immunohaematology, Baden Württemberg)
- Picodrop 2v.08 zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen in Lösungen (Biozym, Oldendorf)
- Reference Manager Version 10 for Windows (Isi Researchsoft™, Thomson Scientific, USA)

2.3 Vektoren und rekombinante Plasmide

Für die heterologe Expression von Epf-Proteinen wurde der Überexpressionsvektor pASK-IBA2 verwendet. Für die homologe Expression von Ralp3 wurde der Vektor pAT18 verwendet. Alle weiteren Vektoren sind in der Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5: Vektoren

Vektorbezeichnung	Größe (bp)	Relevante Charakteristika	Herkunft
pASK-IBA2	3.286	OmpA, <i>Strep</i> -Tag II C-terminal, mcs, f1 ori, Amp ^R , tet p/o	IBA, Göttingen, IMIKRO
pAT18	6.600	shuttle vector, oriR und <i>orfE</i> für Replikation, oriT für Transfer, Er ^R , <i>lacZα</i> -Reporter, mcs	(Trieu-Cuot et al., 1991) IMIKRO
pAT18_ <i>ralp3</i>	9.300	shuttle vector pAT18, Insertion: <i>ralp3</i> mit putativem Promotor und Terminator	IMIKRO

In der Tabelle 2.6 sind die während dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Plasmide dargestellt. Diese wurden in die Stammsammlung der Medizinischen Mikrobiologie der Universität Rostock aufgenommen. Alle Plasmide haben *Escherichia coli* DH5α zum Wirtstamm.

Tabelle 2.6: Rekombinante Plasmide

rekombinantes Plasmid (Größe)	Insertionsfragment (Größe)	Herkunft	endständige Schnittstellen der Insertion 5`/3`
pASK-IBA2_EpfN (4.441 bp)	<i>epfN</i> (1.155 bp)	<i>S. pyogenes</i> M49 (591)	EcoRI/Sall
pASK- IBA2_EpfDUF1-4 (4.516 bp)	<i>epfDUF1-4</i> (1.230 bp)	<i>S. pyogenes</i> M49 (591)	EcoRI/Sall
pASK- IBA2_EpfDUF1-16 (7.429 bp)	<i>epfDUF1-16</i> (3.286 bp)	<i>S. pyogenes</i> M49 (591)	EcoRI/Sall

2.4 Bakterienstämme

Der *Streptococcus pyogenes* Serotyp M49 (591) Stamm ist ein Isolat, das von R. Lütticken (Aachen) zur Verfügung gestellt wurde. Aus diesem Stamm erfolgte die Konstruktion der PCR-Amplifikate von *ralp3*- und *epf*-Genen.

Escherichia coli DH5α (Gibco BRL, Eggenstein) diente als Wirt für Plasmide, die zur Herstellung von Knock-out-Mutanten und Überexpressionsvektoren verwendet wurden.

Die in dieser Arbeit für epidemiologische Untersuchungen verwendeten Bakterienstämme sind Bestandteil der Stammsammlung der Medizinischen Mikrobiologie. In der nachfolgenden Tabelle 2.7 sind die Stämme und ihre Herkunft aufgelistet.

Tabelle 2.7: Für Versuche verwendete Bakterienstämme mit Herkunft

Bakterienstamm	Herkunft
<i>Streptococcus pyogenes</i> M2	Prager Referenzstamm, Tschechien
<i>Streptococcus pyogenes</i> M2:: <i>ralp3</i>	IMI-KRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M2 pAT18 mock	IMI-KRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49	Aachen
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 Δ <i>ralp3</i>	IMI-KRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 Δ <i>ralp3</i> :: <i>ralp3</i>	IMI-KRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 <i>epf</i> ⁻	IMI-KRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 <i>ska</i> ⁻	IMI-KRO
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49 <i>speB</i> ⁻	IMI-KRO
<i>E. coli</i> DH5 α	Gibco BRL, Eggenstein

2.5 Eukaryote Zelllinien

In den Standard-Adhärenz-, -Internalisierung und Beads-basierenden Versuchen wurden die in der Tabelle 2.8 aufgelisteten eukaryoten Zelllinien verwendet. Alle Zelllinien sind Bestandteil der Sammlung der Medizinischen Mikrobiologie.

Tabelle 2.8: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung (Ursprung)	Herkunft	Medium
Ca9-22	gingivale Epithelzellen (Mensch)	DKFZ, Heidelberg	EMEM, 10 % (v/v) FKS
Detroit 562	Pharynx Karzinom (Mensch)	DKFZ, Heidelberg	DMEM:F12, 2 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) FKS
HaCaT	Keratinocyten (Mensch)	DKFZ, Heidelberg (Boukamp et al., 1988)	DMEM (high glucose), 2 mM L-Glutamin, 10 % (v/v) FKS
HEp-2	Larynx Karzinom (Mensch)	DKFZ, Heidelberg	DMEM, 1 mM Pyruvat, 10 % (v/v) FKS
J-774A.1	Monozyten/Makrophagen (Maus)	DKFZ, Heidelberg	DMEM, 10 % (v/v) FKS

Die Anzucht der Zellen erfolgte in entsprechenden Medien (Tabelle 2.8). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm², Greiner Bio-Zone) in 25 ml Medium bei 37 °C und einer 5 % CO₂-Atmosphäre angezogen. Zur Passage und Kultivierung wurden die Zellen von den Flaschen durch Trypsinbehandlung abgelöst und in einer Bürker-Zählkammer gezählt.

2.6 Nährmedien und Zellanzucht

2.6.1 Nährmedien

Die Nährmedien wurden nach der Herstellung bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Nachfolgend ist die Zusammensetzung der Nährmedien bezogen auf 1 l Gesamtvolumen aufgeführt.

<u>BHI-Medium:</u>	Brain-Heart-Infusion	37,0	g
<u>THY-Medium:</u>	Todd-Hewitt-Broth	36,4	g
	Yeast-Extrakt	5,0	g
<u>LB-Medium:</u>	LB-Broth-Base	20,0	g
	NaCl	4,5	g
	pH	7,5	

Die Gram-positiven Spezies wurden entweder in Todd-Hewitt-Yeast-Medium (THY-Medium) oder Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI-Medium) angezogen. *E. coli*-Stämme wurden in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) kultiviert. Für feste Medien erfolgte der Zusatz von 15 g Agar pro Liter Medium.

Für die Substratverwertungs-Versuche wurde ein chemisch definiertes Medium (CDM) genutzt. Die Zusammensetzung des Mediums ist in der Publikation von van de Rijn et al. (van, I and Kessler, 1980) zu finden.

2.6.2 Medienzusätze

Tabelle 2.9: Antibiotika für *E. coli*-Medien

Zusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml A. bidest., sterilfiltriert*	100 µg/ml
Spectinomycin	10 mg/ml A. bidest., sterilfiltriert*	100 µg/ml
Erythromycin	10 mg/ml Ethanol (96 % [v/v])	300 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml A. bidest., sterilfiltriert*	30 µg/ml

Tabelle 2.10: Antibiotika für *S. pyogenes*-Medien

Zusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Spectinomycin	10 mg/ml A. bidest., sterilfiltriert*	60 µg/ml
Erythromycin	10 mg/ml Ethanol (96 % [v/v])	6 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml A. bidest., sterilfiltriert*	300 µg/ml

* Porengröße 0,22 µm. Ethanolhaltige Lösungen wurden nicht sterilfiltriert.

2.6.3 Stammhaltung

E. coli- und *S. pyogenes*-Stämme wurden für max. 7 Tage auf LB- bzw. THY-Agar (2.6.1) bei 4 °C gelagert. Zur Langzeitaufbewahrung wurde 1 ml Über-Nacht-Kultur (12-16 h Inkubation) mit 0,5 ml Glycerin (60 % [v/v] Glycerin) versetzt und bei -80 °C oder entsprechend Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics, Neston, England) gelagert.

2.6.4 Zellanzucht

Die Anzucht aus den -80 °C-Lagerkulturen (entsprechend Microbank™; Pro-Lab Diagnostics, Neston, England) der Mikroorganismen erfolgte zunächst für ca. 24 h auf entsprechenden Agarplatten. Das Beimpfen von flüssigen Über-Nacht-Kulturen erfolgte mit einer sterilen Impföse.

Streptococcus pyogenes wurde generell bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. *E. coli*-Stämme wurden auf Agarplatten bei 37 °C mit Raumluft inkubiert, Flüssigkulturen wurden bei 180 Upm geschüttelt.

2.6.5 Messung der optischen Dichte

Für das Erstellen von Wachstumskurven wurde stündlich die Zunahme der Trübung über die photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm im Spektralphotometer (Bio-Rad-Laboratories, Hercules CA, USA) verfolgt.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pyogenes*

Die DNA aus *S. pyogenes* wurde aus 10 ml Über-Nacht-Kultur nach Herstellerangaben mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) isoliert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA

2.7.2.1 Plasmid Mini-Präparation aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem QIAprep Spin® Miniprep Kit (Qiagen, Hilden). Die Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

2.7.2.2 Plasmidschnellnachweis aus *E. coli* mittels „Colony-Fast-Screen“

Zum Nachweis von Plasmiden in Bakterienkolonien wurde ein „Fast-Screen“ (Biozym, Hess. Oldendorf) vorgenommen. Hierzu wurde die Kolonie mit einer sterilen Impföse vom Nährboden abgenommen und in 6 µl Loading dye suspendiert. Nach Zugabe von 16 µl Lysispuffer wurden die Ansätze 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.7.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA aus Agarosegelen erfolgte nach den Herstellerangaben mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden).

2.7.4 Enzymatische Modifikation von DNA

2.7.4.1 Restriktion von DNA

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde unter von den Herstellern empfohlenen Bedingungen (Tabelle 2.11) durchgeführt. Die Restriktion von PCR-Produkten bzw. Plasmiden erfolgte in der Regel für 3 h bis über Nacht bei 37 °C. Die DNA-Konzentration betrug maximal 500 ng/µl, der Enzymanteil maximal 2,5 % (v/v). Die Reaktionen wurden bei Kontrollrestriktionen durch Zugabe von 6x Loading dye zu 20 µl Reaktionsansatz, ansonsten durch Hitzeinaktivierung des Enzyms beendet. Die Volumina wurden je nach Bedarf zwischen 20 µl und 80 µl variiert. Die vollständige Restriktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.7.7) überprüft. Sollten die hydrolysierten Fragmente später ligiert werden, wurde nach der Restriktion eine Na-Acetat-Fällung (2.7.6.2) durchgeführt.

Tabelle 2.11. Restriktionsenzyme und Puffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Restriktionsendonuclease	Puffer, Arbeitskonzentration
BamHI	B, 1x
EcoRI	H, 1x
PstI	H, 1x
Sall	H, 1x
SphI	H, 1x
XhoI	H, 1x

2.7.4.2 Ligation

Die Ligationen wurden unter Berücksichtigung der molekularen Verhältnisse durchgeführt. In der Regel wurden Vektor und Fragment im molekularen Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Das Volumen der Ligationsansätze betrug 20 µl. Die T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde mit einer Konzentration von 0,1 U/µl im entsprechenden Ligationspuffer eingesetzt. Die Ligationen erfolgten für 16 h bei 16 °C. Die T4-DNA-Ligase wurde anschließend für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und die Ligationsansätze direkt für die Hitzeschock-Transformation (2.8.2) eingesetzt.

2.7.5 *In-vitro* Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR; (Mullis and Faloona, 1987))

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden gezielt DNA-Fragmente für Klonierungen hergestellt. Um eine möglichst geringe Fehlerrate zu gewährleisten, wurde für die Reaktion die Phusion-Polymerase eingesetzt. Diese besitzt eine 3'-5'-Proofreading- Exonuklease-Aktivität (New England Biolabs® Inc.).

2.7.5.1 Standard-PCR

Reaktionsansatz:

genomische Template-DNA	100,0	ng
Oligonukleotide	1,0	µM
dNTP-Gemisch (10 µM)	2,5	µM
Phusion-Polymerase	0,5	U
5x HF-Puffer	10,0	µl
5x Q-Puffer	10,0	µl
A. bidest. steril	ad 50.0	µl

Die Reaktionen erfolgten nach folgendem Schema:

Reaktionszyklen:

Denaturierung	96 °C	5 min	1x
Denaturierung	96 °C	30-60 s	} 24x
Anlagerung	T _m (Primer) – 3-5 °C	30-60 s	
Amplifikation	72 °C	1 min/kbp Fragment	
Amplifikation	72 °C	5 min	1x

2.7.5.2 Primerdesign

Primer der Amplifikate für die Klonierung wurden so konstruiert, dass am 5'- und am 3'-Ende des Amplifikats unter Bildung von Fehlpaarungen Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden.

Die Berechnung der Schmelztemperaturen der Primer erfolgte mit der auf der Internetseite <http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html> verfügbaren Software.

Die Primer wurden so konstruiert, dass das Auftreten von Sekundärstrukturen bildenden Nukleotidsequenzen vermieden wurde und Primer und Gegenprimer eine annähernd gleiche Schmelztemperatur aufwiesen.

2.7.6 Fällung von Nukleinsäuren

2.7.6.1 Isopropanolfällung

Wässrige DNA-Lösungen wurden mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und gründlich gemischt. Die DNA konnte dann durch 30-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g sedimentiert werden. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Pellets mit eiskaltem Ethanol (70 % [v/v]) gewaschen und anschließend für 10 min in der SpeedVac getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in A. bidest. aufgenommen.

2.7.6.2 Natriumacetat-Ethanol Fällung

Wässrige DNA-Lösungen wurden mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (96 % [v/v]) versetzt und gründlich gemischt. Nach der Inkubation für 30-60 min bei -80 °C erfolgte wie oben beschrieben die weitere Behandlung (Zentrifugations- und Waschschrte) (2.7.6.1). Diese Methode wurde vorrangig zur Aufkonzentrierung und Reinigung von PCR-Produkten, Restriktionsansätzen sowie chromosomaler DNA genutzt.

2.7.7 Agarosegelelektrophorese (Sambrook and Gething, 1989)

Die Analyse von DNA erfolgte mit Hilfe ihrer Auftrennung in horizontalen Agarosegelen. In Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente wurde die Agarosekonzentration zwischen 1 und 2 % ([w/v] in 1x TAE-Puffer) eingesetzt. Die Elektrophoresen wurden in der Regel für 0,5-1,5 h bei 70-100 V mit 1x TAE als Laufpuffer durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt, um sie zu beschweren und die Lauffront zu visualisieren. Die Nukleinsäuren im Gel konnten durch 30-minütige Inkubation in einem Ethidiumbromidbad (1 µl/ml A. bidest.) gefärbt und bei einer Wellenlänge von 254 nm in einer Photodokumentationsanlage sichtbar gemacht und fotografiert werden.

6x Loading Dye

Bromphenolblau	0,25	% (w/v)
Xylencyanol	0,25	% (w/v)
Glycerin	30	% (v/v)
EDTA-Na ₂ H ₂ O (0,5 M, pH 8,0)	50	mM

50x Tris-Acetate-EDTA (TAE)-Puffer

Tris-HCl	2,0	M
Eisessig	1,0	M
EDTA-Na ₂ -2 H ₂ O	50,0	mM
pH	7,5	

Als DNA-Längenstandard für die Agarosegelelektrophorese wurde eine 1 kb-DNA Leiter (Fermentas) als Längenstandard verwendet. Diese besteht aus HindIII-geschnittener λ -DNA mit Fragmenten folgender Größe: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500 und 250 bp.

2.7.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA/DNA

(Sambrook and Gething, 1989)

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde photometrisch durch Messen der Absorption bei 260 nm in UV-Küvetten (Uvette®, Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Die Reinheit der Nukleinsäure ließ sich aus dem Verhältnis der OD_{260 nm} zur OD_{280 nm} abschätzen. Bei reinen Lösungen liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0.

2.8 DNA-Transfer in *E.coli*

2.8.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Um *E. coli* DH5 α mit rekombinanten Plasmiden zu transformieren, wurde die Kompetenz der Zellen zuvor mit Hilfe einer CaCl₂-Behandlung ((Hanahan, 1983), mod.) induziert. Hierzu wurde wie folgt vorgegangen:

1. Ausplattieren von *E. coli* auf LB-Agar, Inkubation über Nacht bei 37 °C

2. Überimpfen einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium, Inkubation bei 37 °C und 180 Upm über Nacht
3. Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 1 ml Vorkultur, Inkubation bei 37 °C und 180 Upm bis die Kultur eine OD_{540 nm} von ca. 0,8 erreicht
4. Abkühlen der Kultur für 5 min auf Eis
5. Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 1.100 x g und 4 °C
6. Dekantieren des Überstandes und vorsichtiges Suspendieren des Pellets in 20 ml Lösung 1
7. Zentrifugation: 10 min, 1.100 x g, 4 °C
8. Dekantieren des Überstandes und vorsichtiges Suspendieren des Pellets in 20 ml Lösung 2
9. Inkubation der Suspension für 30 min auf Eis
10. Zentrifugation: 10 min, 1.100 x g, 4 °C
11. Dekantieren des Überstandes und vorsichtiges Suspendieren des Pellets in 5 ml Lösung 2 (eiskalt) und Mischung mit 1,3 ml Glycerin (99 % [v/v])
12. Lagerung dieser Suspension als 100-µl-Alliquots bei -80 °C

Lösung 1

RbCl	10 mM
MOPS (pH 7,0)	10 mM

Lösung 2

RbCl	10 mM
MOPS	100 mM
CaCl ₂	50 mM

Beide Lösungen wurden autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

2.8.2 Hitzeschock-Transformation

Um *E. coli* Wirtszellen mit rekombinanten Plasmiden zu transformieren, wurde wie folgt vorgegangen:

1. Auftauen von CaCl₂-kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen (2.8.1) auf Eis
2. Zugabe von 5 µl Ligationsansatz
3. Inkubation für 30 min auf Eis
4. Hitzeschock: Inkubation der Ansätze für 45 s bei 42 °C
5. Inkubation für 30 s auf Eis

6. Zugabe von 900 µl LB-Medium
7. Regeneration: Inkubation der Ansätze für 1 h bei 37 °C und 450 Upm im Thermomixer
8. Zentrifugation: 2 min, 5.000 x g, RT
9. Dekantieren des Überstandes und vorsichtiges Suspendieren des Pellets in 300 µl LB-Medium
10. Ausplattieren von je 1x 50, 100 und 150 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar mit Selektionszusätzen
11. Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C Ra umluft.

Nach der Inkubation wurde die Kolonienzahl bestimmt. Zur Überprüfung der Transformation wurden Einzelkolonien in 5-ml-Kulturen überimpft und eine Plasmid-Minipräparation (2.7.2.1) durchgeführt.

2.9 DNA-Transfer in *S. pyogenes*

2.9.1 Herstellung kompetenter *S. pyogenes*-Zellen (Caparon and Scott, 1991)

Die Herstellung von kompetenten Zellen für die Transformation erfolgte durch Inkubation der Bakterien in Medium mit 10 mM Glycin, das zur Destabilisierung der Zellwände führt. Die kompetenten Zellen wurden nach folgendem Arbeitsprotokoll gewonnen:

1. 1 Kolonie von der Agarplatte in 5 ml THY-Medium mit 10 mM Glycin aufnehmen; Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂
2. 2 ml der Über-Nacht-Kultur in 40 ml THY/10 mM Glycin/0,125 M Sucrose/Mutanolysin (40 U/ml) überführen; Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂
3. Zentrifugation für 5 min, 1.100 x g, 4 °C; Überstand verwerfen
4. Pellet mit 1 ml Hyaluronidase behandeln (500 U/ml in 1x PBS)
5. Inkubation für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂
6. Pellet 2 x mit je 5 ml 0,625 M Sucrose-Lösung waschen
7. Pellet 2 x mit je 5 ml 1x PBS waschen
8. Pellet in 2 ml 0,625 M Sucrose-Lösung aufnehmen und je 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotieren

Die gewonnenen kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.9.2 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden zunächst elektrokompetente Zellen (2.9.1) auf Eis aufgetaut und anschließend je 100 µl Zellen mit 10 µl Plasmidlösung versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation in Elektroporationsküvetten (2 mm-Gap; peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 1750 V, 481 W, 25 µF und einer Zeitkonstante von 12 ms. Die Proben wurden anschließend in Reaktionsgefäße mit 1 ml THY/0,125 M Sucrose überführt und 5 h bei 37 °C inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation (4.500 Upm, RT), nach der 900 µl des Überstandes entfernt wurden. Der restliche Überstand wurde zum Suspendieren des Pellets genutzt und je 100 µl Suspension auf einer Antibiotika-haltigen Agarplatte ausgebracht. Die Platten wurden ein bis drei Tage anaerob bei 37 °C in Anaerocult®-Gefäßen (Merck KGaA, Darmstadt) mit dem GENbox anaer System (Biomérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) bebrütet. Die auf dem entsprechend selektiven Medium gewachsenen Kolonien wurden in 5 ml THY Flüssigmedium kultiviert und anschließend mit dem MicrobankTMSystem (Pro-Lab Diagnostics, Neston, England) bei -20 °C gelagert.

2.10 Methoden zur Analyse von RNA

2.10.1 Isolierung der RNA aus *S. pyogenes*

Die Isolierung von RNA aus *S. pyogenes*, ausgehend von 30 ml Kultur (Transitionsphase), erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Fast RNA Blue Kit (MP Biomedicals, Frankreich). Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.10.2 Microarray-Analyse

Für die Microarray-Analyse wurden 10 µg RNA eingesetzt. Es wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

1. cDNA-Synthese und gleichzeitige Markierung:
 - 1.1. Inkubation von 10 µg RNA mit Random-Primern (2,5 µM; Promega) und Spike-Ins (1 µM; GE Healthcare) bei 70 °C für 10 min
 - 1.2. Inkubation 10 min auf Eis
 - 1.3. Zugabe von First Strand Buffer (1x; Invitrogen), DTT (0,1 µM; Invitrogen), dNTP-Mix (1 mM dATP, dGTP, und dTTP, 2.5 mM dCTP; Invitrogen), 1.25 µl

Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP (GE Healthcare) im Parallelansatz, und 2 U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen).

- 1.4. Inkubation: 42 °C, 60 min
- 1.5. Inkubation: 70 °C, 10 min
- 1.6. Inkubation: 5 min auf Eis
- 1.7. Zerstörung der Rest-RNA durch Zugabe von 2 U RNaseH (Invitrogen) und einer Inkubation bei RT für 30 min
2. Aufreinigung der markierten cDNA mit CyScribe GFX Purification Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben.
3. Hybridisierung von 200 ng Cy3-markierter cDNA und 200 ng von Cy5-markierter cDNA zusammen auf einem Array (Custom Array GE 8x15K; Agilent) bei 42 °C über Nacht
4. Einlesen der Chips mit dem Agilent G2565AA Scanner
5. Auswertung der Daten mit der Gene Spring GX 11.0.2 Software

2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Zellernte und Zellaufschluss

2.11.1.1 Heterologe Genüberexpression zur Aufreinigung von *Strep*-Tag-Proteinen

Zur Induktion der Proteinexpression für die Aufreinigung von *Strep*-Tag-Proteinen wurden 300 ml LB-Medium, mit entsprechender Menge Selektionszusatz, mit 3 ml einer *E. coli* Über-Nacht-Kultur beimpft und bei 37 °C im Schüttler bis zur exponentiellen Wachstumsphase mit einer OD_{600 nm} von 0,5-0,8 inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT, Endkonzentration 0,2 µg/ml). Nach weiteren 60 min Inkubation bei 30 °C wurde die Kultur 5 min bei 1.100 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment mindestens 24 h bei -20 °C gelagert.

2.11.1.2 Schneller Aufschluss für SDS-PAGE

Rohextrakte von *E. coli*, die lediglich zum Auftragen auf SDS-Polyacrylamidgele vorgesehen waren, wurden gewonnen, indem die Zellen aus 1 ml Zellsuspension durch 1-minütige Zentrifugation bei 1.100 x g und 4 °C sedimentiert, der Überstand dekantiert, die Pellets in 50–100 µl SDS-Probenpuffer suspendiert und 5 min bei 100 °C inkubiert wurden. Zur

Analyse konnten 10-15 µl dieser Suspension auf SDS-Polyacrylamidgele (2.11.4) aufgetragen werden.

2.11.1.3 Ribolyser Aufschluss für die Proteinaufreinigung

Um die Bakterienzellen mittels Ribolyser aufzuschließen, wurde das Gesamtzellsediment der Proteinüberexpression (2.10.1.1) in 1 ml Puffer W suspendiert, bei 13.000 Upm und 4 °C 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurde das Pellet erneut in 1 ml Puffer W gewaschen und die Suspension in Ribolyser-Tubes (Hybaid, Teddington, England) überführt. Anschließend wurde die Suspension zweimal für jeweils 30 s bei maximaler Intensität im Ribolyser geschüttelt. Nach jedem Schritt wurden die Ribolyser-Tubes auf Eis gekühlt. Diese Methode der mechanischen Lyse gewährleistet die Freisetzung der löslichen zellulären Proteine, die im Folgenden durch 10-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C von den übrigen Zellbestandteilen separiert wurden. Der zellfreie Überstand wurde in 10 ml Plastikröhrchen überführt, mit Puffer W auf 5 ml aufgefüllt und die Proteine wurden mittels Affinitätschromatografie an einer *Strep*-Tactin-Sepharose-Matrix (2.11.2) aufgereinigt.

2.11.2 Aufreinigung von rekombinanten *Strep*-Tag-Proteinen

Um die überexprimierten Fusionsproteine von den übrigen Bestandteilen der Lysate zu isolieren, wurde das *Strep*-tag II® Überexpressionssystem (IBA, Göttingen/DE) für die Affinitätschromatografie verwendet. Die Reinigung der Proteine erfolgte nach dem *Strep*-tag II® *Purification Protocol* (IBA GmbH, Göttingen).

Bei Säulenerstbenutzung (IBA GmbH, Göttingen) wurde diese mit 2 ml *Strep*-Tactin-Sepharose (50 % [w/v]) befüllt und sobald sich diese abgesetzt hatte mit je 5 ml Puffer W zweimal äquilibriert. Die Proteinlysate (2.10.1.3) wurden auf die Säulen aufgetragen, wodurch sich die Fusionsproteine spezifisch an die *Strep*-Tactin enthaltende Säulenmatrix binden konnten. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Unspezifisch bindende Proteine konnten durch fünfmaliges Waschen mit je 1 ml Puffer W ausgespült werden, wobei alle fünf Waschfraktionen aufgefangen wurden. Die Fusionsproteine wurden in sechs Schritten mit je 500 µl Puffer E eluiert. Durch dreimaliges Spülen der Sepharose-Matrix mit je 5 ml Puffer R wurde diese regeneriert und mit mehrmaliger Zugabe von je 4 ml Puffer W bis zur vollständigen Entfärbung gewaschen. Die Säule wurde mit 3 ml Aufbewahrungspuffer bei 4 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration der gewonnenen Eluate wurde nach Bradford (2.11.3) bestimmt und die Eluatfraktionen bis zur Analyse in SDS-Polyacrylamidgelen (2.11.4) bei -80 °C gelagert.

Puffer W:

Tris-HCl	100	mM
EDTA-Na ₂ -2H ₂ O	1	mM
NaCl	150	mM
	pH	8,0

Puffer E:

D-Desthiobiotin	2,5	mM
Puffer W		

Puffer R:

HABA	1	mM
Puffer W		

Aufbewahrungspuffer:

Tris-HCl	100	mM
EDTA-Na ₂ -2H ₂ O	1	mM
NaN ₃	0,02	% (w/v)
	pH	8,0

2.11.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen wurden diese 1:100 mit A. bidest. verdünnt. Ein Mililiter dieser Verdünnung wurde mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) versetzt und 1 min bei RT inkubiert. Durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Blindwert mit 1 ml A. bidest. und 200 µl Bradford-Reagenz konnte anhand einer zuvor mit BSA erstellten Eichgerade die Konzentration der Probe errechnet werden.

2.11.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurden Gele mit einem Acrylamidgehalt von 12 % (w/v) verwendet. Sammelgele enthielten stets 4 % Polyacrylamid. Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2.12. Zusammensetzung von verwendeten SDS-Gelelen (Angaben für zwei Gele)

	Sammelgel 4 %	Trenngel 12 %
1,5 M Tris-Lsg.	-	2,5 ml
0,5 M Tris-Lsg.	630 µl	-
10 % SDS	50 µl	100 µl
40 % Acrylamid/Bisacrylamid	666 µl	4,0 ml
10 % APS	40 µl	100 µl
TEMED	15 µl	15 µl
Glycerin	-	1,0 ml
A. bidest.	<i>ad</i> 5 ml	<i>ad</i> 10 ml

Die SDS-PAGE erfolgte in Gelelektrophoresekammern (Bio-Rad, München). Hierzu wurden die Proteinproben im Verhältnis von 4:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen für 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Auftrennung im Sammelgel erfolgte 20 min bei konstanten 80 V. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei konstanten 100 V pro Gel in 1x SDS-Laufpuffer bei RT und wurde beendet, wenn die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

1,5 M Tris-Lsg.

Tris-HCl, (pH 8,8)	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

0,5 M Tris-Lsg.

Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

5x SDS-Laufpuffer

Tris (pH 8,3)	25,0 mM
Glycin	250,0 mM
SDS	0,1 % (w/v)

5x SDS-Probenpuffer

Glycerin	40,00	% (v/v)
Beta-Mercaptoethanol	2,00	% (v/v)
SDS	20,00	% (w/v)
Bromphenolblau	0,05	% (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	0,25	M

2.11.5 Coomassie-Färbung (Weber and Osborn, 1969)

SDS-Polyacrylamidgele (2.11.4) wurden zur unspezifischen Anfärbung der aufgetrennten Proteine für 1-18 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend für 2-3 h in Coomassie-Entfärber entfärbt. Die Entfärbelösung wurde mehrfach gewechselt, die Inkubation erfolgte so lange, bis der Hintergrund ausreichend entfärbt war.

Färbelösung

Serva-Blau R-250	0,625	g
Methanol	111,25	ml
Eisessig	25	ml
A. dest. <i>ad</i>	500	ml

Fixierlösung

Essigsäure	10	%
Ethanol	50	%
A. dest.	40	%

2.11.6 Transfer von Proteinen auf Membranen (Towbin et al., 1979)

Um Proteine aus Polyacrylamidgelen (2.11.4) auf PVDF-Membranen (Bio-Rad, München) zu transferieren, wurde eine Semi-Dry-Blot-Apparatur (Trans-Block SD Semi Dry Transfer Cell, Bio-Rad, München) genutzt. Hierzu wurden 4 Lagen Chromatographiepapier (Whatman 3 MM CHR, Bio-Rad, München) und die Membran auf Gelgröße zurecht geschnitten und in Semi-Dry-Puffer getränkt. In folgender Reihenfolge wurden die Komponenten luftblasenfrei auf die Anodenplatte aufgelegt:

2x Chromatographiepapier
PVDF-Membran
Polyacrylamidgel
2x Chromatographiepapier

Nach Absaugen überschüssigen Puffers mit Laborpapier konnte die Kammer verschlossen und der Blot 35 min bei einer konstanten Spannung von 15 V durchgeführt werden. Das Polyacrylamidgel wurde anschließend einer Coomassie-Färbung (2.11.5) unterzogen.

Semi-Dry-Puffer

Tris	25	mM
Glycin	192	mM
Methanol	20	% (v/v)

2.11.7 Immunologische Detektion von Proteinen

Im Anschluss an einen *Western-Blot* (2.11.6) wurde die Membran 60 min in 50 ml Blockpuffer geschwenkt. Anschließend erfolgten drei 10-minütige Waschschr tte mit 1x PBS. Die Detektion der gesuchten Proteine erfolgte nach Herstellerangaben der entsprechenden Antikörper (Tabelle 2.2).

10x Phosphate Buffered Saline (PBS)

NaCl	187	mM
KCl	2,7	mM
Na ₂ HPO ₄	4,3	mM
NaH ₂ PO ₄	1,4	mM
A. dest. ad	1000	ml
	pH	7,4

Blockpuffer

1x PBS-Lösung mit 10 % (v/v) Magermilch

2.12 Virulenzrelevante Versuche**2.12.1 Adhärenz- und Internalisierungsassay**

Die Adhärenz an und die Internalisierung in humane Epithelzellen wurde an Ca9-22-, Detroit 562-, HaCaT- und HEP-2-Zellen untersucht. Die Assays erfolgten in 24-Well-Mikrotiterplatten. Pro zu testendem Bakterienstamm wurden 3 Vertiefungen für die Bestimmung der Adhärenz- und 3 Kavitäten für die Bestimmung der Internalisierungsraten verwendet. Hierzu wurden in jede Kavität 4×10^5 Zellen in entsprechenden Medien eingesät und die Zellen bei 37  C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 12-18 h bildeten die Zellen einen konfluenten Monolayer und konnten so für die Adhärenz- und Internalisierungs-Assays eingesetzt werden.

Von den zu analysierenden Bakterienstämmen wurden über-Nacht-Kulturen abzentrifugiert, die Bakterien 2 x mit 1x PBS gewaschen und dann in Zellkulturmedium auf eine OD_{600 nm} von

0,5 eingestellt. Dies entspricht einer Bakterienzahl von ca. 1×10^8 /ml. Zur Bestimmung der für die Infektionsversuche eingesetzten Keimzahl wurden ausgehend von dieser Bakteriensuspension Verdünnungsreihen in 1x PBS hergestellt und 100 µl einer jeden Verdünnungsstufe auf THY-Agar ausplattiert.

Nach Entfernung des Mediums von den Zellen wurde diesen jeweils 100 µl Bakteriensuspension und 900 µl frisches DMEM pro Kavität zugesetzt und die Mikrotiterplatten bei 37 °C in einer 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Zur Bestimmung der Zahl adhärenter Bakterien wurde der Überstand 2 h nach der Infektion von den Zellen entfernt und verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 1 ml 1x PBS konnten diese durch Zugabe von 200 µl Trypsin/Well und einer kurzen Inkubation (10 min, 37 °C, 5 % CO₂) vom Plastikmaterial abgelöst werden. Anschließend wurden die Zellen aus den drei Kavitäten in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und die Kavitäten mit weiteren 300 µl 1x PBS ausgewaschen. Diese Waschsuspension wurde ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation (3 min, 5.000 x g, RT) wurde das Sediment in 1 ml Aqua bidest. suspendiert, wodurch die Zellen lysierten und die gebundenen und internalisierten Bakterien freigesetzt wurden. Aus diesem Lysat wurden jeweils 100 µl-Aliquots sukzessiver 1:10 Verdünnungsschritte auf THY-Platten ausplattiert.

Zur Bestimmung der Zahl von internalisierten Bakterienzellen wurde ebenfalls nach 2 h Inkubation der Überstand von den infizierten Zellen entfernt und durch 1 ml DMEM + Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml bzw. 5.000 µg/ml) ersetzt. Während einer weiteren 2-stündigen Inkubation erfolgte dadurch die Abtötung aller ungebundenen und adhären, nicht aber der internalisierten Bakterien. Zur Bestimmung der Anzahl internalisierter Bakterien wurde wie im vorangegangenen Absatz verfahren. So ergab sich aus dem Vergleich der lebensfähigen kolonienbildenden Bakterien zu der eingesetzten Ausgangsmenge an Bakterien der prozentuale Anteil an adhären bzw. internalisierten Bakterienzellen.

2.12.2 Bakteriellles Wachstum in Humanmedien (Nakata et al., 2009a)

Um die Überlebensrate der Bakterien in humanem Voll-Blut und Serum zu untersuchen wurde zunächst eine Über-Nacht-Kultur der Bakterien angesetzt und unter den entsprechenden Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte in einer 1:20 Verdünnung aus der ÜNK. Sobald die Bakterien sich in der frühen exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600\text{ nm}}=0,25$) befanden, wurden 100 µl der Bakteriensuspension entnommen und 1:10.000 in 1x PBS verdünnt. Zur Bestimmung der Bakterienanzahl wurde ausgehend von dieser eingestellten Bakteriensuspension eine

Verdünnungsreihe in 1x PBS hergestellt und zur späteren Auszählung 100 µl einer jeden Verdünnungsstufe auf THY-Platten ausplattiert.

Von der Bakteriensuspension wurden 20 µl mit 480 µl Heparinblut oder Serum versetzt, gründlich gemischt und bei 37 °C und 800 Upm in einem Thermoblock für 3 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden ausgehend von den Blutproben Verdünnungsreihen angefertigt und von jeder Verdünnungsstufe 100 µl auf THY-Agar ausplattiert. Der Vergleich der lebensfähigen kolonienbildenden Bakterien nach 3 h Inkubation in Blut mit der eingesetzten Ausgangsmenge an Bakterien ergab dann den Multiplikationsfaktor als Maß der Überlebensfähigkeit der Bakterien.

2.12.3 Kapsuläre Hyaluronsäure-Messung (Wessels et al., 1991)

Um vergleichende Hyaluronsäure-Analysen zwischen Wildtyp und Mutanten durchzuführen, wurden Über-Nacht-Kulturen von entsprechenden Bakterien im THY-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte in einer 1:20 Verdünnung aus der Über-Nacht-Kultur. In der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600 nm}=0,5) wurden die Kulturen zentrifugiert (5 min; 1110 x g; 4 °C) und die Bakterien 2 x mit A. dest. gewaschen. Das resultierende Sediment wurde in 600 µl A. dest. aufgenommen. Zur Bestimmung der Bakterienzahl wurden ausgehend von dieser Bakteriensuspension Verdünnungsreihen in 1x PBS hergestellt und zur späteren Auszählung 100 µl einer der Verdünnungsstufen 10⁻³ bis 10⁻⁷ auf THY-Platten ausplattiert. Die verbliebenen 500 µl Bakteriensuspension wurden mit 1 ml Chloroform versetzt. Nach 1-minütigem Vortexen folgte ein 1-stündiger Inkubationsschritt bei RT. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 11.000 Upm zentrifugiert und definierte Volumina des Überstandes (10, 20, 50, 80, 100 µl) in neue Reaktionsgefäße überführt und mit A. bidest. auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Den 100 µl-Ansätzen wurde 1 ml Nachweis-Lösung zugegeben und die OD_{640 nm} im Spektralphotometer bestimmt. Anhand einer mit Hyaluronsäure von *Streptococcus suis* erstellten Eichgerade wurde die Hyaluronsäure-Konzentration der Probe errechnet.

Nachweis-Lösung

Stains-all	20 µg
Eisessig	60 µl
Formamid	50 ml
A. bidest. ad	100 ml

2.12.4 Plasminogen-Bindung an Bakterien (Kulisek et al., 1989)

Der chromogene Plasminogenbindungs-Assay ist eine Methode zur Untersuchung bakterieller Bindungskapazität an humanes Plasminogen. Um diese zu untersuchen wurden zunächst Über-Nacht-Kulturen von *S. pyogenes* unter entsprechenden Bedingungen (37 °C; 5 % CO₂) inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5 min; 1.100 x g; 4 °C) wurde das Zellsediment mit 1x PBS gewaschen und anschließend in 1/10 des ÜNK-Volumens aufgenommen. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37 °C von 100 µl eingestellter Bakteriensuspension mit 2,8 ml THY-Medium und 1,2 ml Humanplasma (Sigma) folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min; 1110 x g; 4 °C). Das Pellet wurde mit eiskaltem 1x PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und in 100 µl Plasmin-Substrat-Lösung suspendiert. Die Suspension wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend der Umsatz an Substrat bei 405 nm im Spektralphotometer gemessen.

Plasmin-Substrat-Lösung

H-D-Val-Leu-Lys-p-Nitroanilid	2 Vol.
32 mM Tris (pH 7,5)-1,77 M NaCl-Lösung	3 Vol.

2.12.5 Cysteinproteaseaktivität-Assay

Für die Bestimmung der Aktivität der Cysteinprotease SpeB in GAS-Kulturüberständen wurde die Methode nach Hytonen et al. (Hytonen et al., 2001) angewendet. Um die Aktivitätsmessung durchzuführen wurde zunächst eine Über-Nacht-Kultur der Bakterien angesetzt und unter den entsprechenden Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte in einer 1:20 Verdünnung aus der ÜNK. Sobald die Bakterien sich in der Transitionsphase (OD_{600 nm}=1,0) befanden, wurden diese bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (Porengröße: 0,22 µm). 100 µl der Überstände wurden zur Aktivierung des Enzyms mit Dithiothreitol (DTT; 1 mM) versetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von *N*-benzoyl-proline-phenylalanine-arginine-*p*-nitroanilide hydrochloride (1 mM) und Phosphatpuffer (pH 6; 5 mM) wurde der Umsatz an Substrat bei 405 nm dokumentiert. In Parallelversuchen wurde die Spezifität des Assays mit Cysteinproteaseinhibitor E-64 getestet.

2.13 Transfektion eukaryoter Zellen

Die Transfektion von HaCaT-Zellen mit siRNA erfolgte mit TransPass R2 Reagenz (NEB) nach Herstellerangaben.

2.14 Statistische Analyse

Die statistische Analyse, u. a. die Erstellung von Diagrammen, Berechnung der Standardabweichung und T-Test, wurde mit Microsoft Excel durchgeführt.

Die Berechnung der Signifikanzen (U-Test) erfolgte mit dem auf der Internetseite <http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.cgi> frei verfügbaren Statistikprogramm.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1 Die Rolle des RE-Genblocks in der GAS M49 Pathogenese

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des Fehlens von Ralp3 und Epf auf unterschiedliche virulenzrelevante Charakteristika zu untersuchen. Hierzu wurden die $\Delta ralp3$ - und epf^- -Mutanten (Kreikemeyer et al., 2007b) im Vergleich zum *S. pyogenes* M49 Wildtypstamm in unterschiedlichen Versuchen analysiert.

3.1.1 Die Rolle von Ralp3 in GAS M49 Virulenz

Um die Rolle von Ralp3 im regulatorischen Netzwerk von GAS M49 zu analysieren, wurden verschiedene virulenzrelevante Untersuchungen der $\Delta ralp3$ -Mutante und der $\Delta ralp3::ralp3$ -Komplementante durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung der Stämme auf differenzielle Genregulation mittels DNA-Micro-Array basierenden Transkriptomanalyse.

3.1.1.1 Adhärenz an und Internalisierung in humane Keratinozyten

Die Adhärenz der Bakterien an humane Zielstrukturen ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Kolonisierung und spätere Internalisierung in die Wirtszellen. Da *S. pyogenes* Serotyp M49 ein Patientenisolat der Haut ist, wurde die humane HaCaT-Keratinozyten-Zelllinie für die Adhärenz-, Internalisierung und Zytotoxizitätsversuche verwendet. In der Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

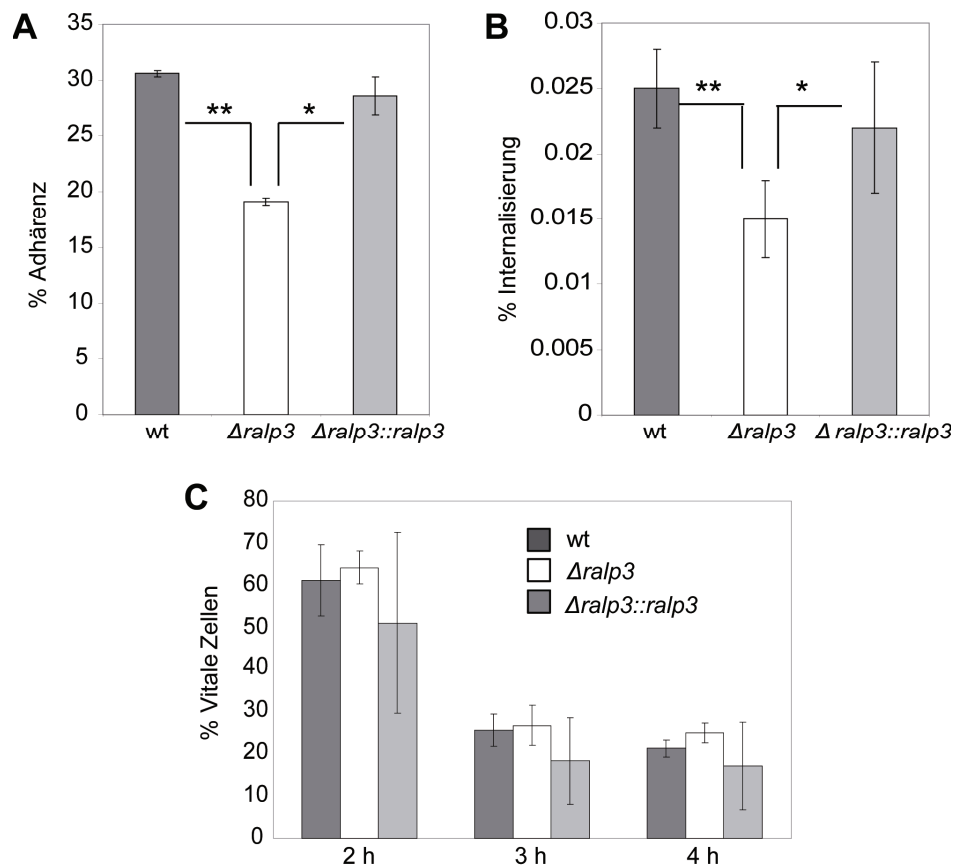


Abbildung 3.1: Adhärenz (A) und Internalisierung (B) des GAS M49 Wildtypstammes (wt) und der $\Delta ralp3$ und $\Delta ralp3::ralp3$ Mutanten an bzw. in HaCaT-Zellen. (C) Zytotoxische Wirkung der Bakterien auf die Keratinocyten in zeitlicher Abhängigkeit. (U-Test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Die in Abbildung 3.1A und B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Adhärenz als auch die Internalisierung der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante signifikant vermindert sind. In beiden Versuchen konnte der Phänotyp des Wildtyps durch die Komplementation der Mutante wiederhergestellt werden. In den Zytotoxizitätsversuchen (Abb. 3.1C) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Mutanten beobachtet werden, jedoch sinkt die Anzahl der vitalen HaCaT-Zellen drei Stunden nach Infektion rapide ab.

3.1.1.2 Das Überleben von GAS M49 in unterschiedlichen Medien

Ein weiteres für die Virulenz von *S. pyogenes* relevantes Kriterium ist die Überlebensfähigkeit der Bakterien im Blut. Um generelle Wachstumsdefizite der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante auszuschließen, wurde das Wachstum der Bakterien im Komplexmedium THY bei 37 °C und 5 %-CO₂-Atmosphäre untersucht. Hierzu wurden stündlich die optischen Dichten der Kulturen bei 600 nm bestimmt. Der Versuch zeigte, dass die Stämme ein ähnliches Wachstumsverhalten aufweisen (Abbildung 3.2A). Etwa zweieinhalb Stunden nach Beimpfen der Kulturen setzte bei allen Stämmen die exponentielle Wachstumsphase ein.

Nach etwa sechs Stunden befanden sich die Kulturen im Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase (Transitionsphase). Alle drei Stämme hatten nach 10 h Wachstum annähernd identische optische Dichten zwischen 1,38 und 1,42 erreicht.

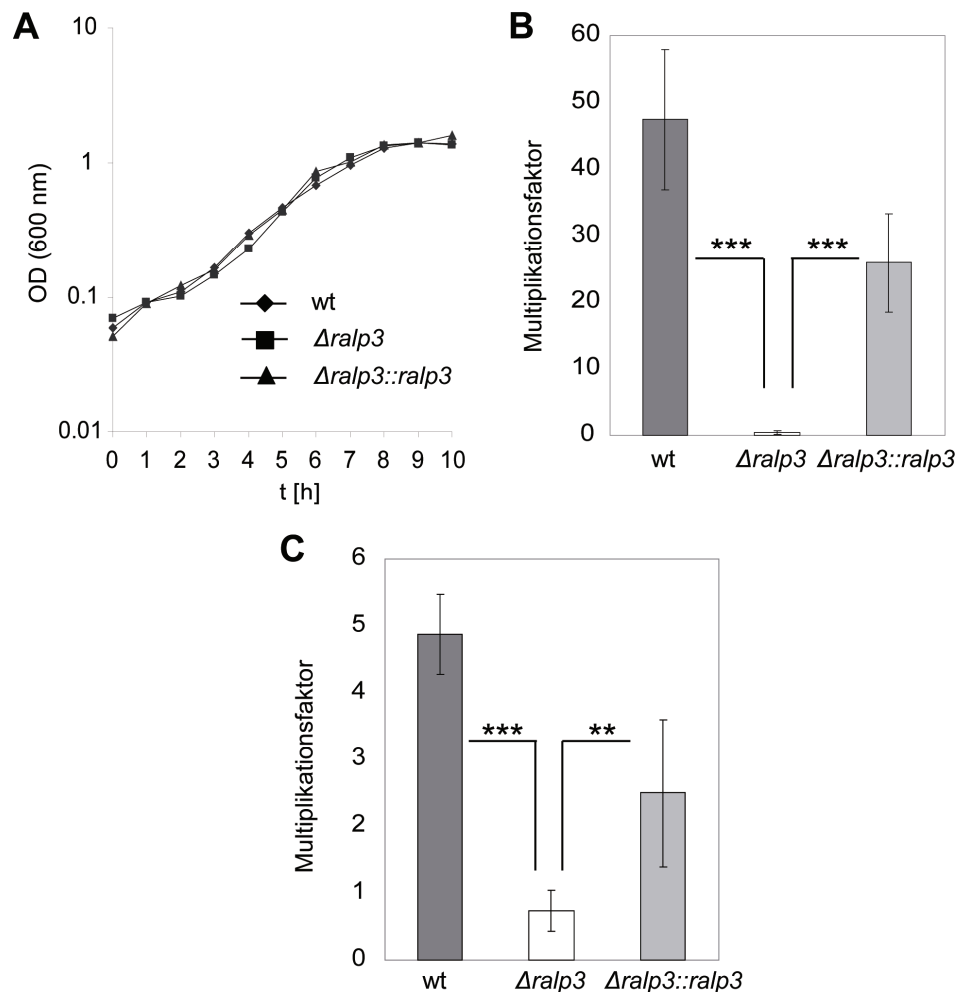


Abbildung 3.2: (A) Wachstum von *S. pyogenes* M49 Wildtyp (wt), $\Delta ralp3$ und $\Delta ralp3::ralp3$ Mutanten in THY-Medium. Multiplikationsfaktor der Lebendkeimzahl von GAS M49 im Humanblut (B) und Humanserum (C). (U-Test; **p < 0,01, ***p < 0,001).

Um die Überlebensrate der Bakterien im Blut und Serum zu bestimmen, wurden die Zellen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für 3 h bei 37 °C in dem jeweiligen Medium inkubiert (2.12.2). Ausgehend von der Lebendkeimzahl der inokulierten Bakteriensuspension und der Lebendkeimzahl nach 3 h Inkubation im jeweiligen Humanmedium, wurde der Multiplikationsfaktor bestimmt. Die Wildtyp-Keimzahl stieg nach 3 h Inkubation in humanem Vollblut um den Faktor 46 (Abb. 3.2B), in Humanserum um den Faktor 5 (Abb. 3.2C). Die $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante zeigte in beiden Medien kein signifikantes Wachstum, jeweils unter dem Faktor 1, d.h. die Mutante war nicht überlebensfähig in beiden Medien. Die Komplementation der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante konnte den Phänotyp des Wildtyps annähernd wieder herstellen.

3.1.1.3 Der Hyaluronsäuregehalt der Kapsel

Hyaluronsäure ist ein Polysaccharid, das von den Bakterien sekretiert wird und um die Bakterien eine kapsuläre Struktur bildet. Frühere Arbeiten belegen, dass die Kapsel die Bakterien vor Phagozytose schützt (Wessels and Bronze, 1994) und somit für die Virulenz der Bakterien eine entscheidende Rolle spielt.

Anhand einer Standard-Kurve wurde der Anteil an Hyaluronsäure in *S. pyogenes* M49 Wildtyp, $\Delta ralp3$ und $\Delta ralp3::ralp3$ Mutanten bestimmt (2.11.1). Für den Wildtyp ergaben diese Messungen einen Wert von 10,3 fg/CFU. Im Vergleich dazu wurde für die *ralp3*-Mutante mit 7,4 fg/CFU ein um etwa 34 % verringerter Hyaluronsäuregehalt ermittelt.

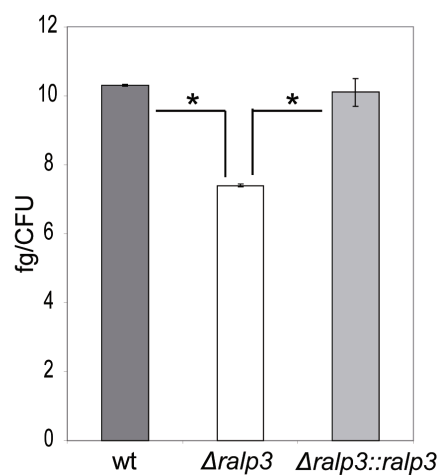


Abbildung 3.3: Kapsulärer Hyaluronsäure-Anteil im *S. pyogenes* M49 (591) Wildtyp im Vergleich zu $\Delta ralp3$ und $\Delta ralp3::ralp3$ Mutanten. (U-Test; * $p < 0,05$).

Wie der Abbildung 3.3 entnommen werden kann, weist die $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante einen signifikant verminderten Hyaluronsäure-Anteil in der Kapsel auf. Die *ralp3*-Komplementation führte zur Wiederherstellung der Hyaluronsäurekapsel.

3.1.1.4 Plasminogenbindung

Plasminogen ist ein Glycoprotein und wird als Vorstufe von Plasmin in der Leber synthetisiert (Dano et al., 1985a). Plasmin ist eine Serinprotease, die u. a. für die Fibrinsspaltung verantwortlich ist (Ponting et al., 1992a). GAS können Plasminogen direkt über zahlreiche Oberflächenproteine binden und mittels sekretierter Streptokinase (Ska) zu Plasmin aktivieren (Lahteenmaki et al., 2001). Diese Eigenschaft wird im hier verwendeten Test genutzt.

Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie in 2.12.4 beschrieben. Dazu wurden Bakteriensuspensionen mit humanem Plasma inkubiert. Nach dem Waschen der Bakterien

wurden diese mit einer Plasmin-Substrat-Lösung inkubiert und anschließend der Umsatz von Plasminogen zu Plasmin bei einer OD von 405 nm im Spektralphotometer verfolgt.

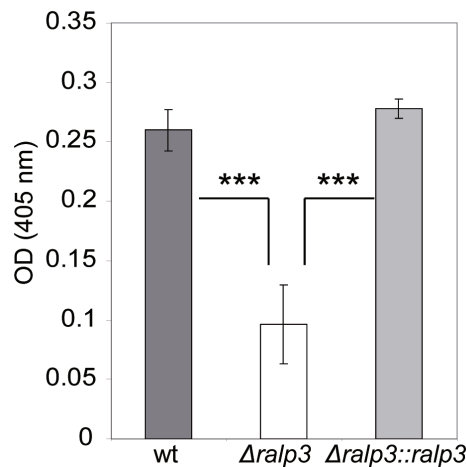


Abbildung 3.4: Oberflächenassoziierte Messung von Plasmin auf der Oberfläche von GAS M49 Wildtyp (wt) und *Ralp3*-Mutanten. (U-Test; *** $p < 0,001$).

Wie aus dem Diagramm (Abbildung 3.4) ersichtlich wird, besitzt die $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verminderte Fähigkeit humanes Plasminogen zu binden und zu Plasmin umzuwandeln. Der Wert sinkt für die $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante von 0,26 (Wildtyp) auf 0,096.

3.1.1.5 SpeB-Aktivität in den Kulturüberständen von GAS M49

SpeB (Streptococcal pyrogenic exotoxin B) ist eine von GAS sekretierte Cysteinprotease. Sie wird über Sekretionsporen des Sec-Sekretionsweges sezerniert (Rosch and Caparon, 2004). Nach der Sekretion wird das Proenzym in die enzymatisch aktive Form umgewandelt und ist danach an vielen Pathogenitätsmechanismen wie Wirtszelladhärenz, -internalisierung, -toxizität und Apoptose beteiligt (Cunningham, 2000).

Die Bestimmung der SpeB-Aktivität in den Überständen der Bakterien erfolgte mittels eines Cysteinprotease-Assays (2.12.5). Eine GAS M49 *speB*⁻-Insertionsmutante wurde als Negativkontrolle verwendet. Die gemessene SpeB-Aktivität des Wildtyps wurde gleich 100 % gesetzt und die Aktivitäten der Mutanten auf 100 % des Wildtyps bezogen.

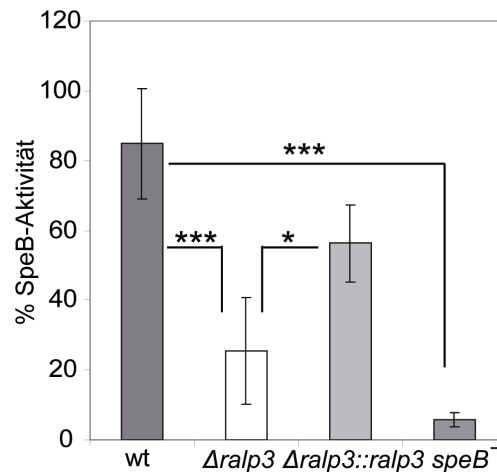


Abbildung 3.5: SpeB-Aktivität in den Überständen von *S. pyogenes* M49 Wildtyp (wt) und den Ralp3- und SpeB-Mutanten. (U-Test; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Wie der Abbildung 3.5 entnommen werden kann, zeigte die $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp eine um ca. 60 % signifikant verminderte SpeB-Aktivität, was auf geringere Mengen des Exotoxins im Kulturüberstand zurückzuführen ist. Die als Negativkontrolle verwendete $speB^-$ -Insertionsmutante zeigt kaum Aktivität.

3.1.1.6 Ralp3-Transkriptom

Um den in den vorangegangenen Versuchen bestimmten Phänotyp der *S. pyogenes* M49 $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante näher zu charakterisieren und das regulatorische Netzwerk von Ralp3 zu untersuchen, wurden vergleichende, globale Transkriptomanalysen mittels DNA-Micro-Array-Systems durchgeführt.

Es erfolgte ein direkter Vergleich der spezifischen mRNA-Mengen zwischen GAS M49 Wildtyp und $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante aus der Transitionsphase, da *ralp3* das Expressionsmaximum zu diesem Zeitpunkt aufweist (Kreikemeyer et al., 2007b). Für die Analyse wurden Custom Arrays GE 8x15 (Agilent) verwendet. Diese ermöglichen sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen, da pro Array jeweils vier biologische und vier technische Replikate gewährleistet sind und für die Auswertung ein Dye Swap Verfahren angewendet wird. Dabei wurde die Cy5-markierte cDNA des Wildtyps zusammen mit der Cy3-markierten cDNA der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante auf den dafür vorgesehenen Sondenfeldern hybridisiert. Um farbstoffspezifische Einflüsse auszuschließen, wurden die Farbstoffe getauscht (Wildtyp-Cy3, $\Delta ralp3$ -Cy5) und die markierte cDNA ebenfalls auf dem gleichen Array in den dafür vorgesehenen Sondenfeldern hybridisiert. Die Daten der Analyse sind im Anhang (Tabelle A1) aufgelistet. Die Abbildung 3.6 zeigt eine Übersicht der Analyse.

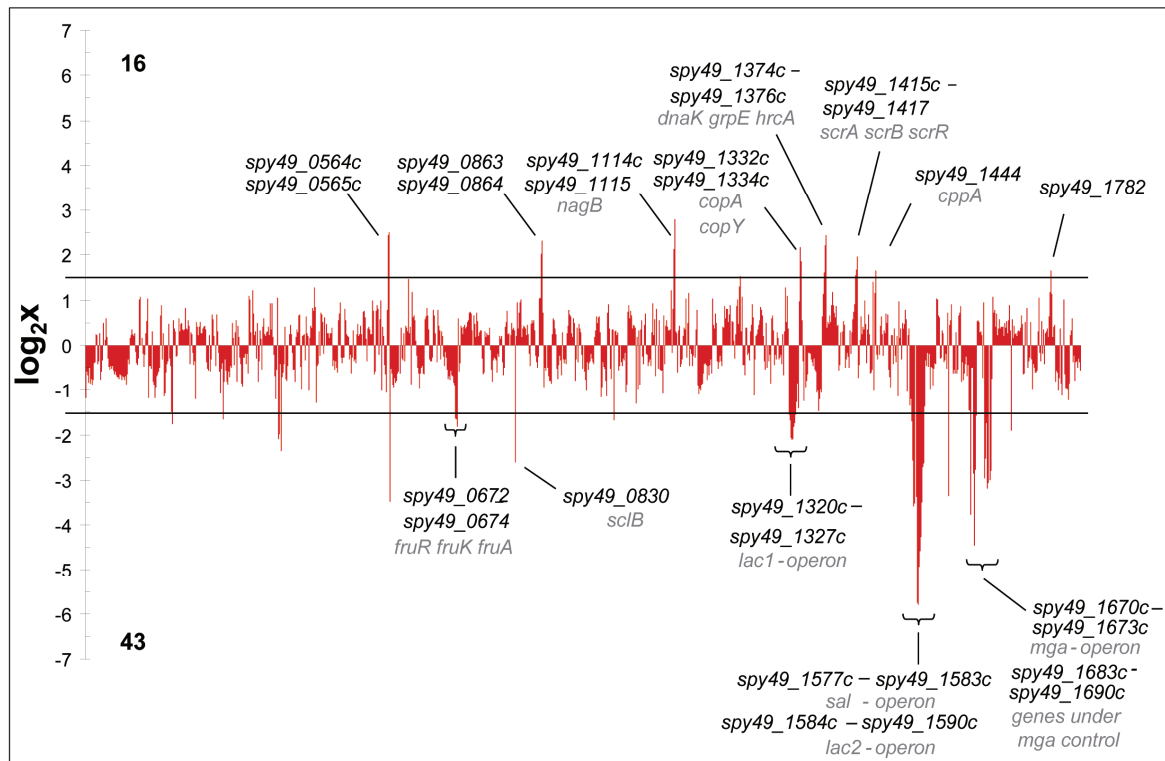


Abbildung 3.6: Überblick über die Expression der Gene in der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante im Vergleich zum GAS M49 Wildtyp. Gezeigt ist die \log_2 -Expression der Ratio. Alle Gene mit einer positiven \log_2 -Expression $\geq 1,58$ (gleich $\geq 3,0$) zeigen in der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante induzierte Genexpression. Alle Gene mit einer negativer \log_2 -Expression $\leq -1,58$ (gleich $\leq -3,0$) zeigen eine signifikante Reduktion der Genexpression. Alle Gene zwischen den schwarzen Linien zeigen in der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante keine veränderte Genexpression.

Insgesamt zeigte die Micro-Array-Analyse, dass die Transkription von 16 Genen (1 %) in der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante signifikant erhöht ist. Die Transkription von 43 Genen (2,5 %) ist signifikant vermindert. Die Mehrheit der Gene (59,4 %) zeigte keine Veränderung in der Genexpression und 37,1 % zeigten unter den gewählten Bedingungen keine Expression oder erwiesen sich aufgrund der statistischen Analyse als nicht robust.

3.1.1.7 Gene mit signifikant veränderten Transkripten in der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante

Die detaillierten Ergebnisse aller 43 signifikant reprimierten und 16 signifikant induzierten Gene, welche mindestens ein $\leq -3,0$ -fach vermindertes bzw. $\geq 3,0$ -fach erhöhtes Transkript aufwiesen, sind in der Tabelle 3.1 dargestellt. Gezeigt ist die \log_2 -Expression der Ratio. Alle Gene mit einer positiven \log_2 -Expression $\geq 1,58$ (gleich $\geq 3,0$) zeigen in der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante induzierte Genexpression. Alle Gene mit einer negativer \log_2 -Expression $\leq -1,58$ (gleich $\leq -3,0$) zeigen eine signifikante Reduktion der Genexpression.

Tabelle 3.1: Gene mit signifikant verminderten (A) oder erhöhten (B) Transkriptmengen in der *S. pyogenes* M49 Δ ra/p3-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Zusätzlich ist die Standardabweichung (SD) aufgelistet. Für ausgewählte Gene wurde zur Bestätigung der Array-Daten qRT-PCR durchgeführt.

log ₂ -Expression der Ratio						
ORF#	Gen	Beschreibung	Array 1	Array 2	Ratio	SD
(A) Gene mit signifikant verminderten Transkriptmengen						
spy49_0162	opuABC	L-proline Glycine Betaine ABC transportpermease	-1.75	-1.69	-1.72	0.05
spy49_0254c	-	transposase	-1.65	-1.71	-1.68	0.04
spy49_0343	-	hypothetical protein	-2.09	-2.04	-2.07	0.03
spy49_0344	-	hypothetical protein	-2.00	-1.97	-1.99	0.02
spy49_0347	-	hypothetical protein	-2.36	-2.40	-2.38	0.03
spy49_0672	fruR	Putative transcriptional repressor	-1.64	-1.64	-1.64	0.00
spy49_0673	fruK	Tagatose-6-phosphate kinase	-1.65	-1.69	-1.67	0.03
spy49_0674	fruA	PTS system, fructose-specific IIABC component	-1.82	-1.87	-1.84	0.04
spy49_0830	scIB	ScIB protein	-2.60	-2.64	-2.62	0.02
spy49_1024	-	hypothetical protein	-1.68	-1.71	-1.69	0.02
spy49_1321c	-	hypothetical protein	-1.68	-1.72	-1.70	0.03
spy49_1322c	lacD1	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	-2.08	-2.07	-2.07	0.01
spy49_1323c	lacC1	Tagatose-6-phosphate kinase	-2.10	-2.08	-2.09	0.01
spy49_1324c	-	Tagatose-6-phosphate kinase	-2.09	-2.08	-2.09	0.00
spy49_1325c	lacB	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB	-1.81	-1.80	-1.81	0.01
spy49_1326c	lacA	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA	-1.73	-1.76	-1.75	0.02
spy49_1577c	salK	SalK	-1.71	-1.67	-1.69	0.02
spy49_1578c	salY	Putative ABC transporter	-2.57	-2.69	-2.63	0.08
						-1.97 ± 0.75
						-1.80 ± 0.98
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
						-
				</		

-1.97 ± 0.75

spy49_1579c	<i>salX</i>	Putative salivaricin A ABC transporter	-3.58	-3.95	-3.77	0.26	-
spy49_1580c	<i>salT</i>	Putative salivaricin A modification enzyme	-3.52	-4.58	-4.05	0.75	-4.21 ± 1.08
spy49_1582c	<i>salB</i>	Putative salivaricin A modification enzyme	-3.37	-4.57	-3.97	0.85	-
spy49_1583c	<i>salA</i>	Lantibiotic salivaricin A precursor	-5.75	-5.71	-5.73	0.03	-6.01 ± 0.45
spy49_1584c	<i>lacG</i>	6-phospho-beta-galactosidase	-5.80	-5.88	-5.84	0.06	-
spy49_1585c	<i>lacE</i>	PTS system, lactose-specific IIBC component	-4.94	-4.98	-4.96	0.03	-5.45 ± 1.08
spy49_1586c	<i>lacF</i>	PTS system, lactose-specific IIA component	-4.59	-4.56	-4.57	0.02	-
spy49_1587c	<i>lacD2</i>	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	-4.26	-4.42	-4.34	0.12	-
spy49_1588c	<i>lacC2</i>	tagatose-6-phosphate kinase	-3.50	-3.64	-3.57	0.10	-
spy49_1589c	<i>lacB2</i>	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB	-2.70	-2.66	-2.68	0.03	-
spy49_1590c	<i>lacA2</i>	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA	-2.62	-2.66	-2.64	0.03	-1.61 ± 2.08
spy49_1633c	<i>scIA</i>	Collagen-like surface protein	-3.35	-3.39	-3.37	0.03	-
spy49_1668c	-	Cell surface/Fibronectin-binding protein	-3.77	-3.89	-3.83	0.08	-
spy49_1670c	<i>ennX</i>	EnnX protein	-2.86	-2.86	-2.86	0.00	-
spy49_1671c	<i>emm49</i>	Antiphagocytic M protein	-4.45	-4.51	-4.48	0.04	-5.16 ± 0.65
spy49_1672c	-	Fc-gamma receptor	-2.79	-2.76	-2.77	0.02	-
spy49_1673c	<i>mga</i>	M protein trans-acting positive regulator (Mga)	-1.58	-1.81	-1.70	0.17	-1.36 ± 0.16
spy49_1683c	<i>sfbX49</i>	Fibronectin-binding protein	-2.97	-3.06	-3.01	0.06	-
spy49_1684c	<i>sof</i>	Serum opacity factor	-2.54	-3.03	-2.78	0.35	-2.71 ± 0.90
spy49_1686	-	hypothetical protein	-1.73	-2.30	-2.02	0.40	-
spy49_1687c	<i>ropA</i>	Proteinase maturation protein (RopA)	-3.18	-3.15	-3.16	0.02	-
spy49_1688c	-	hypothetical protein	-3.07	-3.08	-3.08	0.01	-
spy49_1689c	-	Spi SpeB protease inhibitor	-3.00	-3.09	-3.04	0.06	-

spy49_1690c	<i>speB</i>	Streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB)	-2.79	-2.87	-2.83	0.06	-
spy49_1719c	<i>csp</i>	Major cold-shock protein	-1.90	-1.80	-1.85	0.07	-
(B) Gene mit signifikant erhöhten Transkriptmengen							
spy49_0564c	-	Transposase	2.45	2.47	2.46	0.01	-
spy49_0565c	-	Transposase	2.51	2.43	2.47	0.06	-
spy49_0863	<i>malP</i>	Putative L-malate permease	2.03	2.06	2.05	0.02	1.13 ± 0.50
spy49_0864	-	NAD-dependent malic enzyme	2.33	2.25	2.29	0.06	-
spy49_1114c	-	Putative 16S pseudouridylate synthetase	2.13	2.26	2.20	0.09	-
spy49_1115c	<i>nagB</i>	Glucosamine-6-phosphate deaminase	2.80	2.97	2.88	0.12	-
spy49_1239	-	Alpha-mannosidase	1.53	1.63	1.58	0.07	-
spy49_1332c	<i>copA</i>	Putative copper-transporting ATPase	2.18	2.18	2.18	0.00	-
spy49_1334c	<i>copY</i>	Negative transcriptional regulator, CopY	1.86	1.87	1.87	0.01	2.41 ± 0.12
spy49_1374c	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	1.61	1.50	1.56	0.08	-
spy49_1375c	<i>grpE</i>	heat shock protein GrpE	2.21	2.25	2.23	0.03	-
spy49_1376c	<i>hrcA</i>	heat-inducible transcription repressor	2.44	2.47	2.45	0.02	3.05 ± 0.39
spy49_1416	<i>scrB</i>	Sucrose-6-phosphate hydrolase	1.67	2.00	1.83	0.23	-
spy49_1417	<i>scrR</i>	Putative sucrose operon repressor	1.96	1.96	1.96	0.00	1.48 ± 0.62
spy49_1444c	<i>cspA</i>	Putative C3-degrading proteinase	1.65	1.63	1.64	0.02	-
spy49_1782	-	hypothetical protein	1.65	1.71	1.68	0.04	-

Unter den reprimierten Genen in der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante konnte eine Präferenz für ganze Operon-/Regulonstrukturen festgestellt werden. Unter anderem wurden Gene mit metabolischer Funktion, wie z.B. beide Lac-Operone (*lacABC1D1* und *lacA2B2C2D2EFG*) und *fru*-Operon (*fruAKR*), gefunden. Weiter sind Gene des putativen Salivaricin-Operons (*salABTXYK*), welche für ein mögliches Lanthibiotikum kodieren, in der Mutante signifikant reduziert. Abgesehen von den Genen, die für metabolische Funktionen kodieren, weisen vor allem Virulenzgene, wie z.B. das Mga-Regulon (*mga*, *spy49_1672*, *emm49*, *ennX*, *spy49_1668*) und weitere Gene die unter Mga-Kontrolle stehen (*sfbX49*, *sof*, *speB*), signifikant verminderte Transkriptmengen auf.

Unter den hochregulierten Genen konnte keine Präferenz für Operon-/Regulonstrukturen festgestellt werden. Gene des Metabolismus (*malP*, *scrB*, *scrR*), Proteinabbaus (*ccpA*) und der Stressantwort (*dnaK*, *grpE*, *hrcA*) zeigten in der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante signifikant erhöhte Transkriptmengen.

Um die Ergebnisse der DNA-Micro-Array-Analyse abzusichern, wurde zusätzlich qRT-PCR für ausgewählte Gene durchgeführt. Die Ergebnisse sind ebenfalls in der Tabelle 3.1 dargestellt. In allen 14 getesteten Fällen konnten die Ergebnisse der DNA-Micro-Array-Analyse bestätigt werden.

3.1.1.8 Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen

Die DNA-Micro-Array-Analyse lieferte interessante Ergebnisse. Die $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante wies signifikant verminderte Transkriptmengen der Gene der beiden *lac*-Operone und des *fru*-Operons auf. Alle drei sind unter anderem für Zuckeraufnahme, -umwandlung und –transport zuständig. Um den GAS M49 Wildtyp und die *ralp3*-Deletionsmutante hinsichtlich der Fähigkeit der Verwertung von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen zu untersuchen, wurden Biolog-Phenotyp-Micro-Arrays verwendet. Dieses System bietet die Möglichkeit, im Kleinformat (96-Well-Platten) 190 unterschiedliche Kohlenstoffquellen zu testen. Die Versuche wurden im chemisch definierten Medium (CDM; (van, I and Kessler, 1980)) ohne Zusätze durchgeführt. Nach einem 24 h-Wachstum wurde die Endpunkt-OD bei 600 nm bestimmt. Das Wachstum des Wildtyps in der Gegenwart von Glukose wurde gleich 100 % (= 1,0) gesetzt und alle weiteren Messungen auf dieses Wachstum bezogen. 10 % (= 0,1) des Wildtyp-Glukose-Wachstums wurden als vitales Wachstum definiert.

Sowohl der *S. pyogenes* M49 Wildtyp als auch die $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante zeigten ein Wachstum auf 20 unterschiedlichen C-Quellen. Es handelt sich dabei um: N-Acetyl-D-Glukosamin, Tween40, Tween80, D-Fruktose, α -D-Glukose, α -D-Laktose, D-Trehalose, Maltose, Maltotriose, D-Mannose, Saccharose, Salicin, D-Glukosamine, Pekctin, Uridin, Mannan, N-Acetyl- β -D-Mannosamin, β -Methyl-D-Glukosid, Dextrin und Gelatin.

Ausschließlich der Wildtyp konnte 3-O- β -D-Galaktopyranosyl-D-Arabinose als Kohlenstoffquelle nutzen. Die $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante zeigte ein signifikant erhöhtes Wachstum auf folgenden C-Quellen: D-Laktose, D-Trehalose und Maltotriose. Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Verwertung von Kohlenstoffquellen durch GAS M49 Wildtyp und $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante. Signifikante Unterschiede sind dargestellt. Die optische Dichte bei 600 nm des Wildtypwachstums auf α -D-Glucose wurde gleich 1 gesetzt und alle weiteren Messungen auf dieses Wachstum bezogen.

Substrat	GAS M49		<i>p</i>
	Wildtyp	$\Delta ralp3$	
α -D-Laktose	0.29 \pm 0.06	0.77 \pm 0.18	0.032
D-Trehalose	0.47 \pm 0.03	0.73 \pm 0.05	0.001
Maltose	0.87 \pm 0.05	0.71 \pm 0.05	0.041
Maltotriose	0.77 \pm 0.06	1.16 \pm 0.09	0.005
3-O- β -D-Galaktopyranosyl-D-Arabinose	0.27 \pm 0.02	0.04 \pm 0.06	0.005

3.1.2 Heterologe Expression von *Ralp3* in *S. pyogenes* Serotyp M2

3.1.2.1 Nachweis des *ralp3*-Transkripts in GAS M2::*ralp3*

Wie schon in der Einleitung beschrieben, kommen *ralp3*-homologe Gene ausschließlich in den GAS Serotypen M1, M4, M12, M28 und M49 vor. In allen weiteren getesteten Serotypen konnte kein RE-Genblock detektiert werden (Kreikemeyer et al., 2007b). Um den Einfluss des *ralp3*-Regulatorgens auf die nicht-RE-Genblock-tragende Serotypen zu untersuchen, wurde exemplarisch der *S. pyogenes* Serotyp M2 ausgewählt. GAS M2 wurde mit dem rekombinanten Plasmid *ralp3*_pAT18 (Kreikemeyer et al., 2007b) elektroporiert (2.9.2) und die *ralp3*- und *kana*^R-Transkripte mittels Northern-Blot nachgewiesen. In der Abbildung 3.7 ist das Ergebnis dargestellt.

Wie der Abbildung 3.7 entnommen werden kann, konnte *ralp3* erfolgreich in GAS M2 heterolog exprimiert werden.

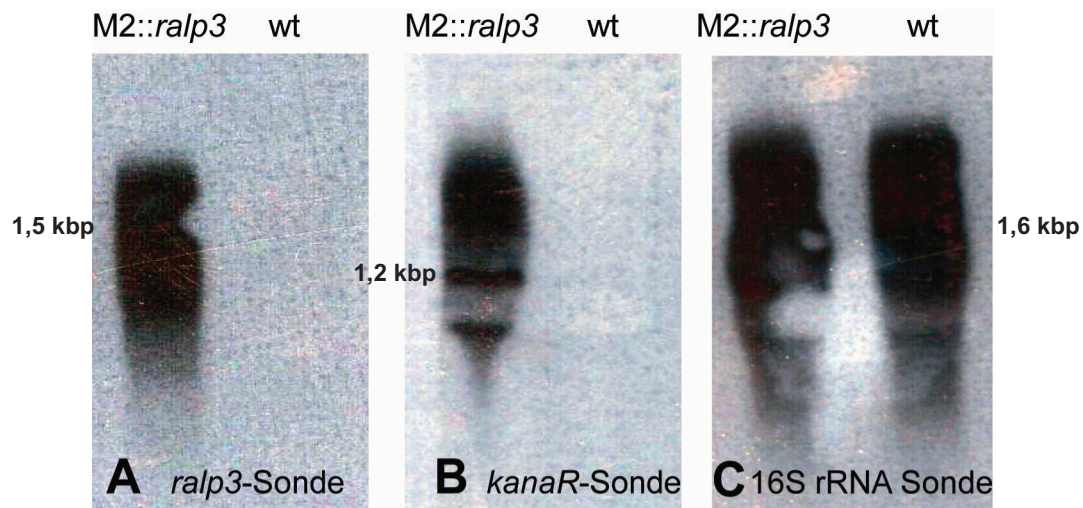


Abbildung 3.7: Northern-Blot-Analysen von *ralp3*-, *kana^R*- und 16S rRNA-Sonden. Gesamt-RNA (5 µg/Spur in A und B) von *S. pyogenes* M2 Wildtyp (wt) und M2::*ralp3*. Die Hybridisierung erfolgte mit DIG-markierten Sonden gegen *ralp3*, *kana^R* und 16S rRNA.

3.1.2.2 Adhärenz an und Internalisierung in humane Epithelzellen

Die Fähigkeit an humane Zielstrukturen zu adhären ist die Voraussetzung für erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes. In diesem Versuch wurde der Einfluss der heterologen *ralp3*-Expression auf das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von GAS M2 an humanen Zelllinien HaCaT (Keratinocyten) und HEp-2 (Larynxcarcinom) untersucht. Das Ergebnis der Untersuchungen ist in der Abbildung 3.8 dargestellt.

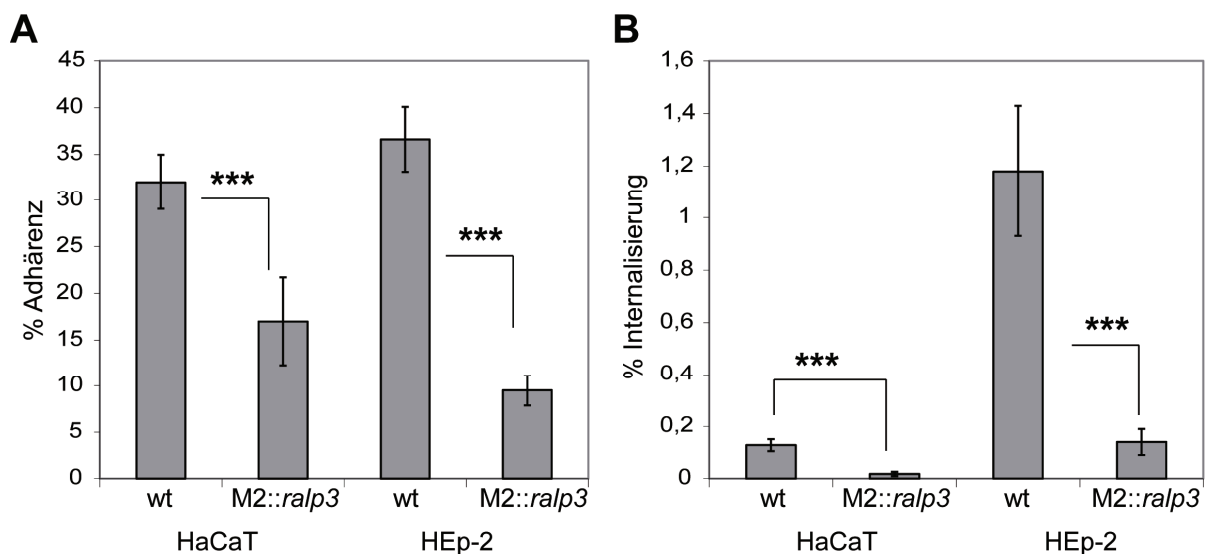


Abbildung 3.8: Adhärenz (A) und Internalisierung (B) des GAS M2 Wildtypstammes (wt) und der M2::*ralp3*-Mutante an bzw. in HaCaT- und HEp-2-Zellen. (U-test; *** $p < 0,001$).

Die in Abbildung 3.8 A und B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Adhärenz als auch die Internalisierung der M2::*ralp3*-Mutante in beide Zelllinien signifikant vermindert sind. Während der Wildtyp mit 32 % an HaCaT- und 36,6 % an HEp-2-Zellen adhärierte, betrug die Adhärenzrate der M2::*ralp3*-Mutante 17 bzw. 9,5 %. Die Internalisierungsrate sank signifikant von 0,13 % auf 0,018 % für Keratinozyten und von 1,2 % auf 0,14 % bei HEp-2-Zellen.

3.1.2.3 Das Überleben von GAS M2 in unterschiedlichen Medien

Wie auch schon für *S. pyogenes* Serotyp M49 wurde die Überlebensfähigkeit des Serotyps M2 in Humanmedien untersucht. Um generelle Wachstumsdefizite der M2::*ralp3*-Mutante auszuschließen, wurde das Wachstum der Bakterien im Komplexmedium THY bei 37 °C und 5 %-CO₂-Atmosphäre untersucht. Der Versuch zeigte, dass die Stämme ein vergleichbares Wachstumsverhalten aufweisen (Abbildung 3.9A). Etwa eine Stunde nach Beimpfen der Kulturen setzte bei allen Stämmen die exponentielle Wachstumsphase ein. Nach etwa vier Stunden befanden sich die Kulturen in der Transitionsphase. Beide Stämme hatten nach 8 h Wachstum annähernd identische optische Dichten zwischen 1,3 und 1,35 erreicht.

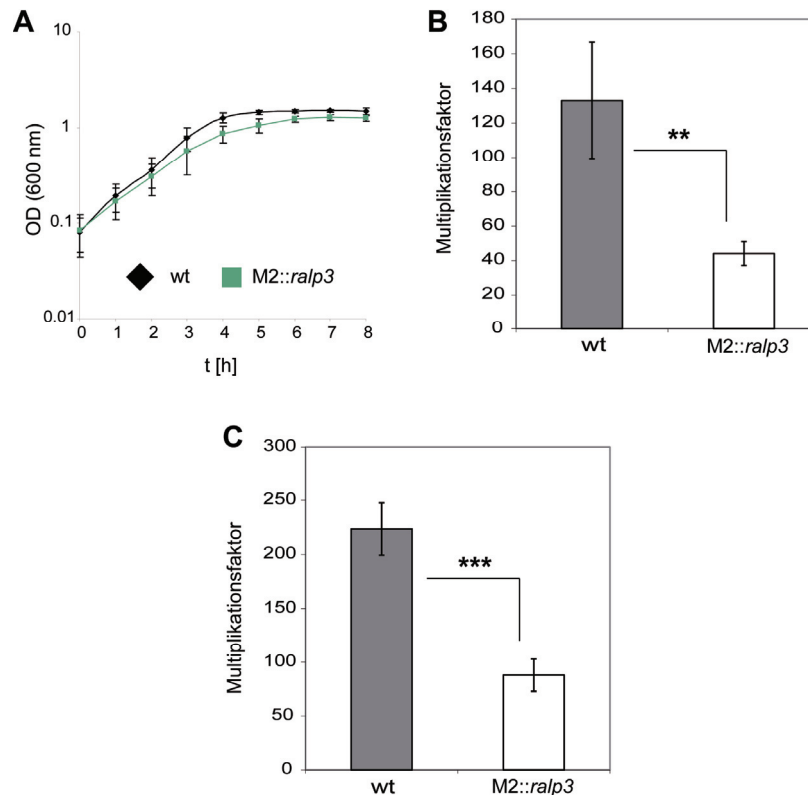


Abbildung 3.9: (A) Wachstum von *S. pyogenes* M2 Wildtyp (wt) und M2::*ralp3*-Mutante in THY-Medium. Multiplikationsfaktor der Lebendkeimzahl von GAS M2 im Humanblut (B) und Humanserum (C). (U-Test; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Ausgehend von der Lebendkeimzahl der inokulierten Bakteriensuspension und der Lebendkeimzahl nach 3 h Inkubation im jeweiligen Humanmedium, wurde der Multiplikationsfaktor errechnet. Die Wildtyp-Keimzahl stieg nach 3 h Inkubation in humanem Vollblut um den Faktor 133 (Abb. 3.9B), in Humanserum um den Faktor 223,6. (Abb. 3.9C) an. Die M2::*ralp3*-Mutante zeigte in beiden Medien ein signifikant verlangsamtes Wachstum. Der Multiplikationsfaktor betrug 44 in Blut und 88 in Humanserum.

3.1.3 Funktionale Analysen von Epf

Das in der ERES-Region von *S. pyogenes* M49 kodierte Protein Epf besteht aus einem N-terminalen Ende mit einem Signalpeptid (AS 1-34) und einer Abfolge von 16 Domänen unbekannter Funktion (DUF1542) (Kreikemeyer et al., 2007b). Ein Ziel dieser Arbeit war es, den für die Adhärenz an humane Zielstrukturen verantwortlichen Bereich des Proteins zu identifizieren.

Zu diesem Zweck sollten verschiedene Abschnitte von Epf aus *S. pyogenes* M49 heterolog exprimiert, affinitätschromatographisch aufgereinigt und für Adhärenzstudien zur Verfügung gestellt werden.

3.1.3.1 Adhärenz an und Internalisierung in humane Epithelzellen

Die Adhärenz der Bakterien an humane Epithelzellen ermöglicht den Bakterien eine erfolgreiche Kolonisierung und spätere Internalisierung in diese. Um die Funktion von Epf als ein mögliches Adhäsins zu untersuchen, wurden Standard-Adhärenz- und Internalisierungsversuche mit der *S. pyogenes epf*⁻-Insertionsmutante (Kreikemeyer et al., 2007b) durchgeführt. Für die Versuche wurden die Epithelzellen Ca9-22, Detroit562, HaCaT und HEp-2 (Tabelle 2.8) ausgewählt. In der Abbildung 3.10 ist das Ergebnis dargestellt.

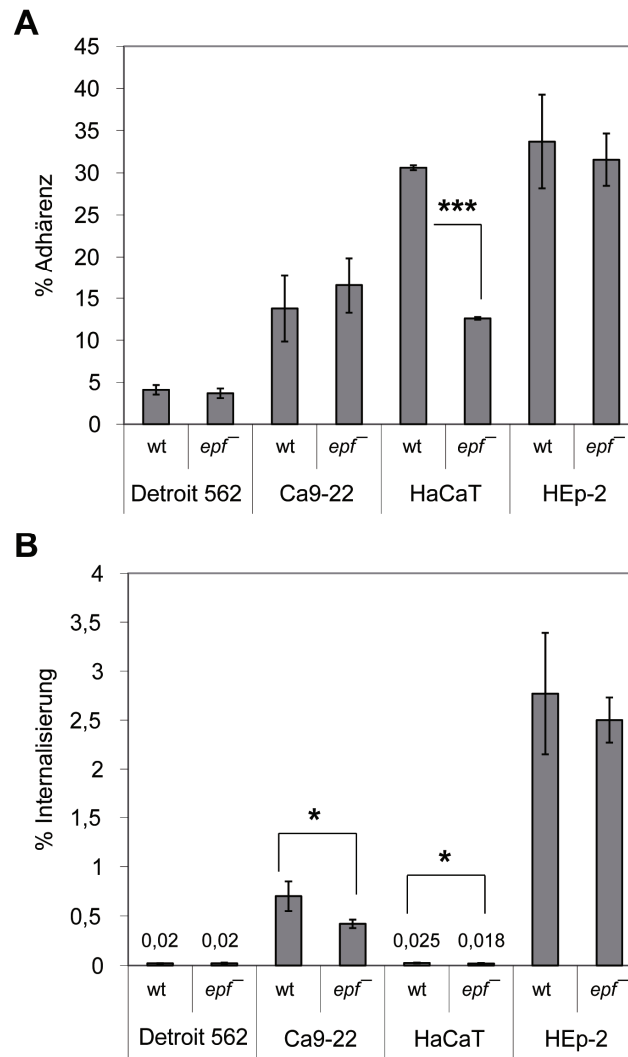


Abbildung 3.10: Adhärenz (A) und Internalisierung (B) des GAS M49 Wildtypstammes (wt) und der *epf*⁻-Insertionsmutante an bzw. in humane Epithelzellen. (U-Test; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Die in Abbildung 3.10A und B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die *epf*⁻-Insertionsmutante eine um 41 % signifikant verminderte Adhärenz an HaCaT-Zellen aufweist. Die Adhäsionsraten an andere Epithelzellen bleiben im Vergleich zum Wildtyp annähernd unverändert. Bei den Internalisierungsversuchen konnte eine signifikant verminderte Invasion der *epf*⁻-Insertionsmutante in die Ca9-22- und HaCaT-Zellen beobachtet werden.

3.1.3.2 Auswahl des Expressionssystems

Für Überexpressions-Versuche sollten drei verschiedene Fragmente des *epf*-Gens kloniert werden. Die Fragmente sind in der Tabelle 2.6 aufgelistet. Für die Proteinfragmentexpression wurde der Überexpressionsvektor pASK-IBA2 verwendet (IBA, Göttingen). Der Vektor kodiert eine Ampicillinresistenzkassette, zur Selektion

plasmidtragender Klone, und ein OmpA-Leaderpeptid, das für die Sekretion der exprimierten, rekombinanten Proteine ins Periplasma verantwortlich ist. Des Weiteren enthält der Vektor eine Peptidsequenz, den C-terminal-lokalisierten *Strep*-Tactin Affinitätstag (*Strep*-tag II), mit welchem fusionierte rekombinante Proteine säulenaффinitätschromatografisch an einer *Strep*-Tactin-Sepharose-Matrix aufgereinigt werden können (Skerra and Schmidt, 2000).

3.1.3.3 Amplifikation und Klonierung der *epf*-Fragmente

Um den Bereich, der für die Adhärenz an humane Zielstrukturen verantwortlich ist, einzugrenzen, wurden unterschiedliche Sequenzen des Gens mit dem pASK-IBA2 Vektor ligiert. Dabei handelt es sich um die Fragmente *epfN*, welches das N-terminale Ende ohne Signalsequenz umfasst, *epfDUF1-4*, das die ersten vier DUF-Repeats umfasst und *epfDUF1-16*, welches für alle 16 DUF-Repeats kodiert (Abbildung 1.3). Alle drei *epf*-Fragmente, *epfN*, *epfDUF1-4* und *epfDUF1-16*, wurden mit den in der Tabelle 3.3 aufgelisteten Primern mittels PCR (2.7.5) amplifiziert, anschließend einer EcoRI/Sall-Restriktion (2.7.4.1) unterzogen und mit dem ebenfalls EcoRI/Sall hydrolysiertem pASK-IBA2 Vektor ligiert (2.7.4.2). Nach der Ligation erfolgte die Hitzeschocktransformation von *E.coli* DH5α (2.8.2).

Tabelle 3.3: Oligonukleotide zur Amplifikation von *epf*-Fragmenten aus GAS M49

Fragment	Primerpaar	Sequenz 5' → 3'
<i>epfN</i>	<i>epfN</i> -for	CATTCAGCGAATTCAATGGCGTGATGGTCGTAAAG
	<i>epfN</i> -rev	CTGGTTTTTCGTCGACCGGTTTTCTGGTAGCCA
<i>epfDUF1-4</i>	DUF1-for	CCAGAAGAATTCGAAGGCGAAAAACCAGTACAAA
	DUF1-4-rev	GCTTTTTGCTTGTCTGACTGCAAGAAGTTTTTC
<i>epfDUF1-16</i>	DUF1-for	CCAGAAGAATTCGAAGGCGAAAAACCAGTACAAA
	DUF1-16-rev	CTTTAGCTACGTCGACAAGATTAGCTTTAGCAGC

Die unterstrichenen Sequenzabschnitte sind Restriktionsstellen.

Nach Selektion auf Ampicillinresistenz konnten rekombinante Klone durch Kontrollrestriktionen (Abbildung 3.11) entsprechender Plasmid-DNA nachgewiesen werden.

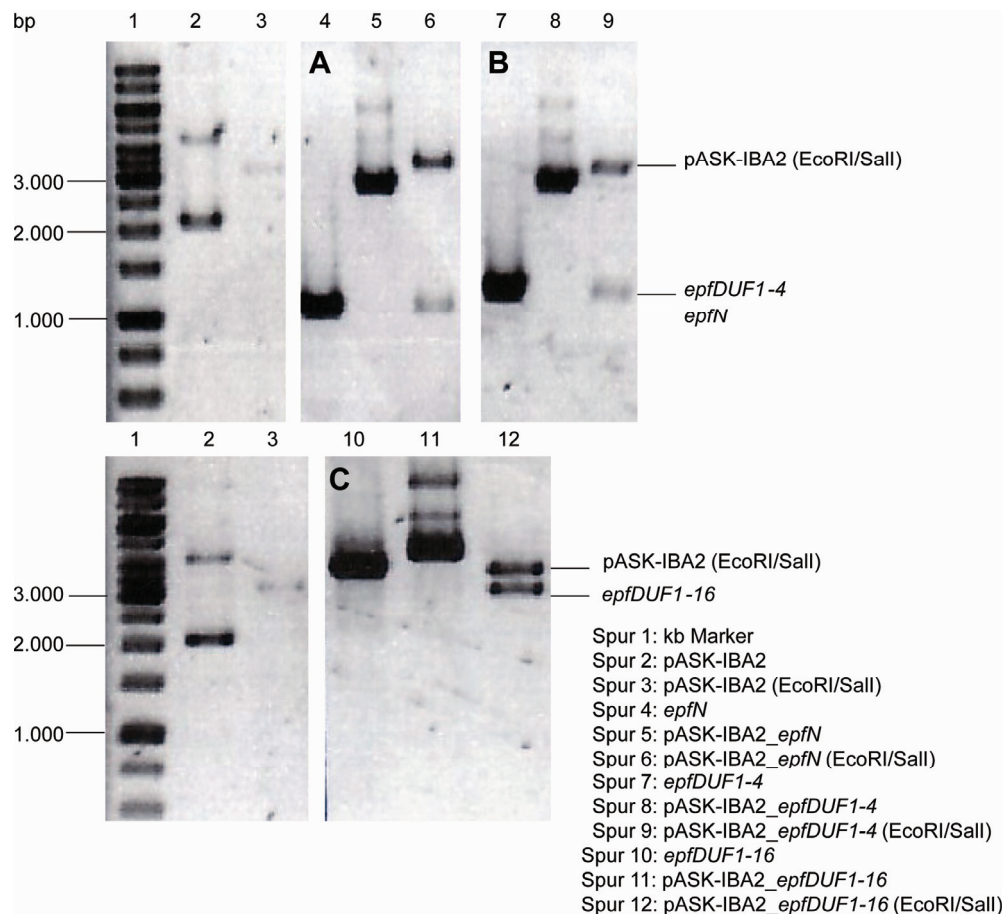


Abbildung 3.11: Kontrollrestriktion von pASK-IBA2_ *epfN* (A), pASK-IBA2_ *epfDUF1-4* (B) und pASK-IBA2_ *epfDUF1-16* (C). Dargestellt ist ein 1 %iges Agarosegel.

Die Abbildung 3.11 zeigt die erwarteten zwei Banden für die jeweilige Kontrollrestriktion. Die eine Bande stellt den linearisierten pASK-IBA2 Vektor, die andere das klonierte PCR-Produkt, dar.

3.1.3.4 Heterologe Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung der *Strep*-Tag-markierten rekombinanten Proteine EpfN, EpfDUF1-4 und EpfDUF1-16

Für die Expressionsversuche wurden die entsprechenden Stämme im LB-Medium (2.6.1) bei 37 °C in einem Schüttelinkubator angezogen. Nachdem die Kulturen eine OD_{600 nm} von 0,3 erreicht hatten, erfolgte die Induktion der Expression der rekombinanten Proteine mittels Zugabe von AHT (Endkonzentration: 0,2 µg/ml). Nach 1 h wurden die Zellen geerntet. Zum Zeitpunkt der Induktion und der Zellernte wurden je 1 ml der Kultur entnommen und für die Auftrennung im SDS-Gel einem schnellen Aufschluss unterzogen (2.11.1.2). Nach der Bestätigung von rekombinanten Proteinen in den Rohextrakten, wurden die geklärten Lysate

geernteter Zellen (2.11.1.3) einer *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie (2.11.2) unterzogen. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (2.11.4) und *Western*-Blot-Analyse (2.11.6) überprüft.

In der Abbildung 3.12A sind die Ergebnisse der *Western*-Blot-Analyse von *E. coli* Rohextrakten vor und nach der Induktion dargestellt. In den Spuren 2, 4 und 6 konnte keine Bande detektiert werden. In den Spuren 3, 5 und 7 konnte für die jeweiligen Proteine entsprechende Bande mittels *Strep*-Tactin-AP-Konjugats detektiert werden. Auf die erfolgreiche Induktion schloss sich die affinitätschromatographische Afreinigung der Proteine über *Strep*-Tactin-Sepharose an. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.12B, C und D dargestellt.

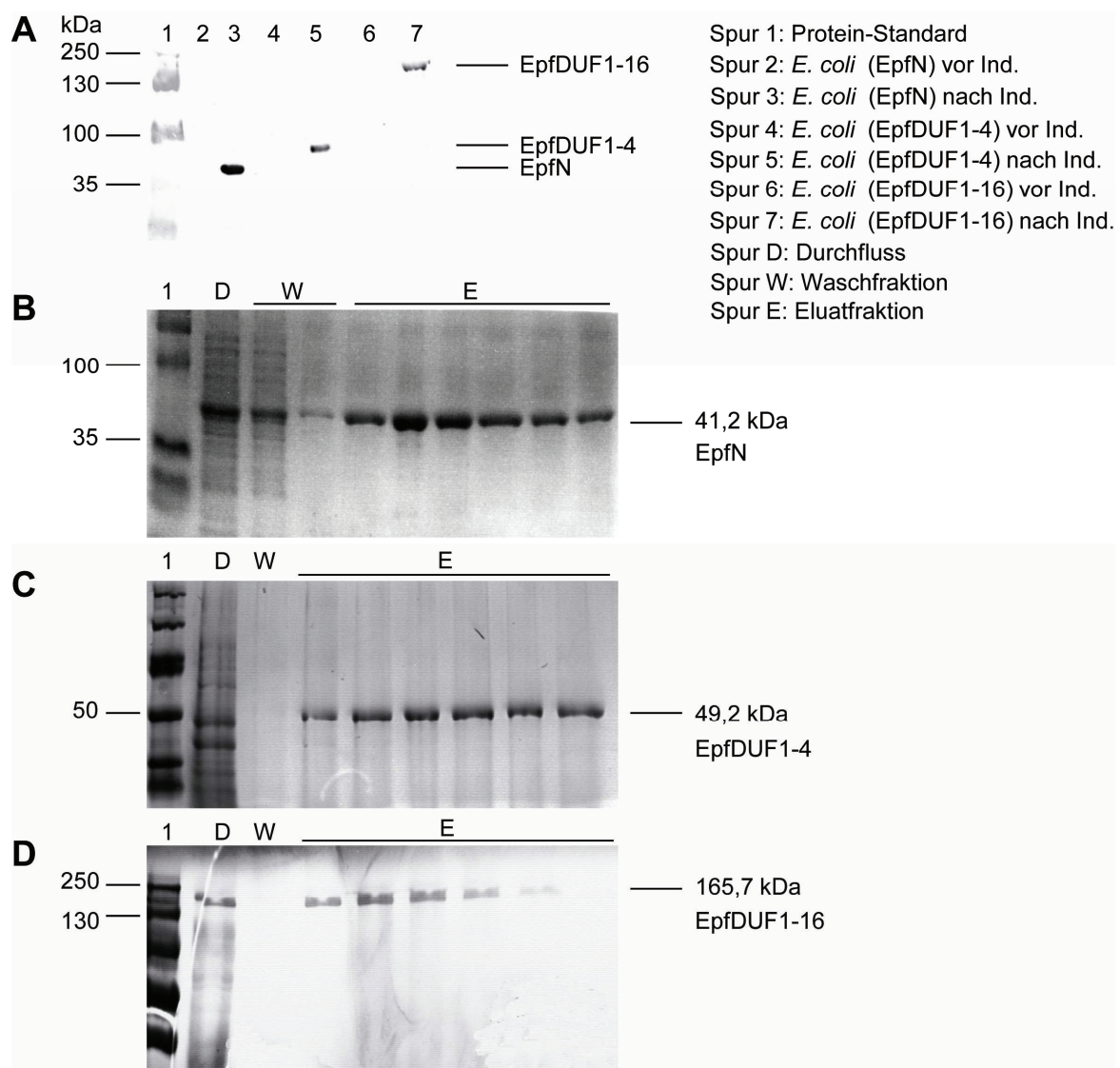


Abbildung 3.12: (A) BCIP/NBT-*Blue*-detektierte *Western*-Blot-Membran zur Kontrolle der *E. coli* Rohextrakte vor und nach Induktion (Ind.). SDS-Polyacrylamidgele zur Überprüfung der Proteinaufreinigung von EpfN (B), EpfDUF1-4 (C) und EpfDUF1-16 (D).

Die Spuren E der Abbildung 3.12 zeigen in den Eluatfraktionen die aufgereinigten rekombinanten Proteine EpfN, EpfDUF1-4 und EpfDUF1-16.

3.1.3.5 Nachweis von Epf als bakterielles Adhäsın

Um die direkte Bindefähigkeit der rekombinanten Proteine EpfN, EpfDUF1-4 und EpfDUF1-16 zu untersuchen, wurden gelb-fluoreszierende Beads mit rekombinanten Proteinen bei 4 °C ü.N. beschichtet, anschließend mehrfach mit 1x PBS gewaschen und mit BSA geblockt. Die Infektion der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte mit 35 Beads/Zelle für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Nach der Inkubation wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurde die Anzahl von adhärenen Beads ins Verhältnis zu gezählten Zellen gesetzt. Zusätzlich wurden die Epithelzellen im Parallelansatz mit Plasminogen behandelt und mit der gleichen Strategie, wie o.g., infiziert.

Die Ergebnisse der Untersuchung mit dem rekombinanten EpfN sind in der Abbildung 3.13 und der Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Kalkulation der Beads/Zelle für das rekombinante Protein EpfN.

Zelllinie	Beadsbehandlung/Zellbehandlung	Anzahl der Beads/Zelle	p
Ca9-22	unbehandelt/unbehandelt	0,0508 ± 0,0021	-
	EpfN/unbehandelt	0,2164 ± 0,0042	0,006
	EpfN/Plasminogen	0,229 ± 0,080	0,068
Detroit562	unbehandelt/unbehandelt	0,0041 ± 0,0001	-
	EpfN/unbehandelt	0,0125 ± 0,0022	0,058
	EpfN/Plasminogen	0,011 ± 0,011	0,076
HaCaT	unbehandelt/unbehandelt	0,035 ± 0,025	-
	EpfN/unbehandelt	0,014 ± 0,001	0,211
	EpfN/Plasminogen	0,440 ± 0,035	0,002
HEp-2	unbehandelt/unbehandelt	0.07 ± 0.047	-
	EpfN/unbehandelt	0.35 ± 0.082	0,006
	EpfN/Plasminogen	0.65 ± 0.276	0.011

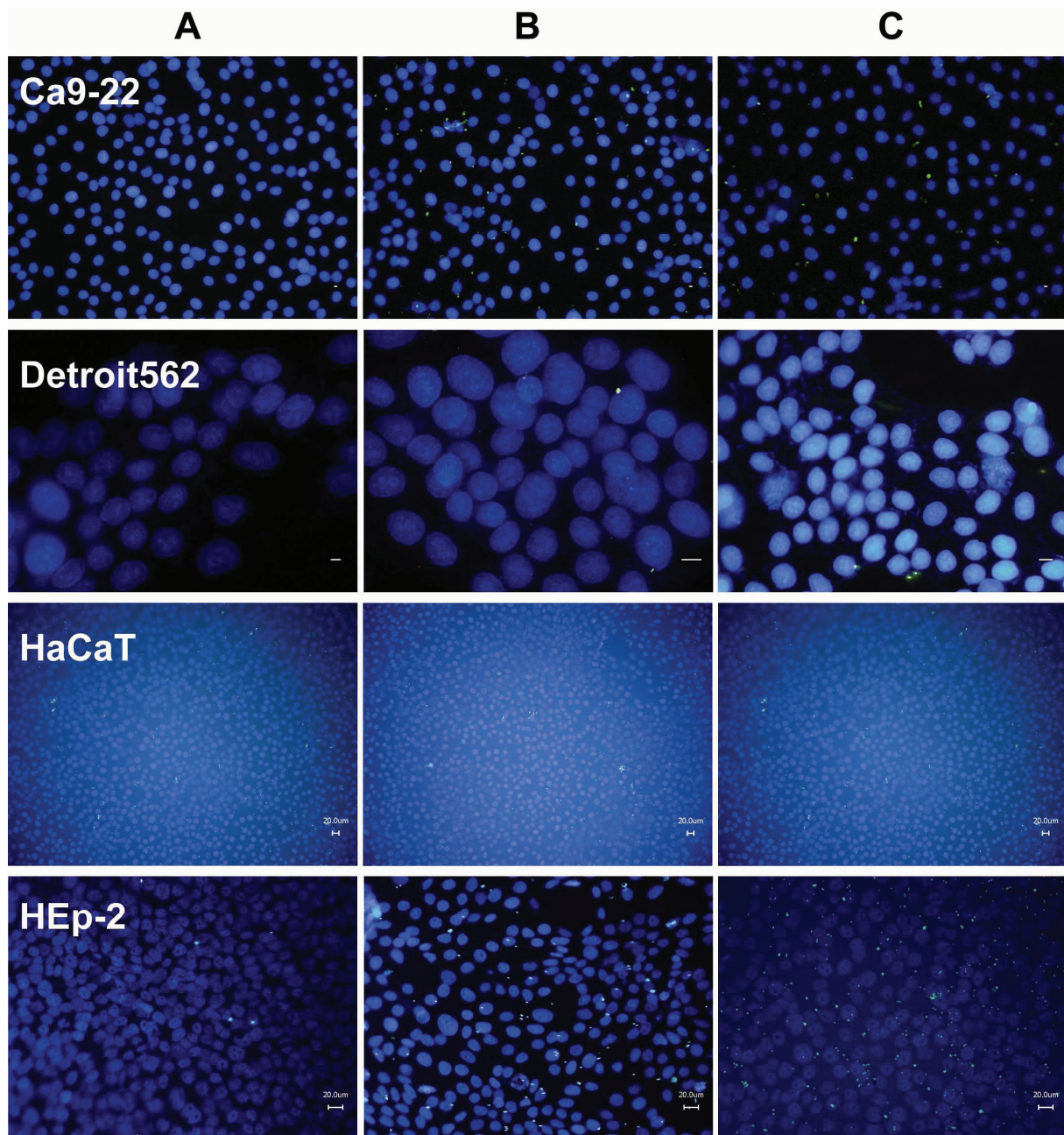


Abbildung 3.13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EpfN-beschichteten grün-fluoreszierenden Beads an Ca9-22-, Detroit562-, HaCaT- und HEp-2-Zellen nach 2 h Infektion. (A) Unbehandelte Zellen infiziert mit unbehandelten Beads. (B) Unbehandelte Zellen mit EpfN-beschichteten Beads. (C) Plasminogen-behandelte Zellen mit EpfN-beschichteten Beads.

Aus den in der Abbildung 3.13 und der Tabelle 3.4 dargestellten Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. EpfN bindet direkt an Ca9-22- und HEp-2-Zellen
2. EpfN adhärirt nicht an Detroit562- und HaCaT-Zellen
3. Die Plasminogenbehandlung der Ca9-22- und Detroit562-Zellen hat keinen Einfluss auf die Adhärenz von EpfN an diese

4. Die Plasminogenbehandlung der HaCaT-Zellen ermöglicht die Adhäsion von EpfN an diese Zelllinie
5. Die Plasminogenbehandlung verstärkt die Adhärenz von EpfN an HEp-2-Zellen.

In den Versuchen mit rekombinanten EpfDUF1-4 und EpfDUF1-16 konnte keine Adhäsion der beschichteten Beads an die Zellen beobachtet werden. In der Abbildung 3.14 und der Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse der Untersuchung der HEp-2-Zellen exemplarisch dargestellt.

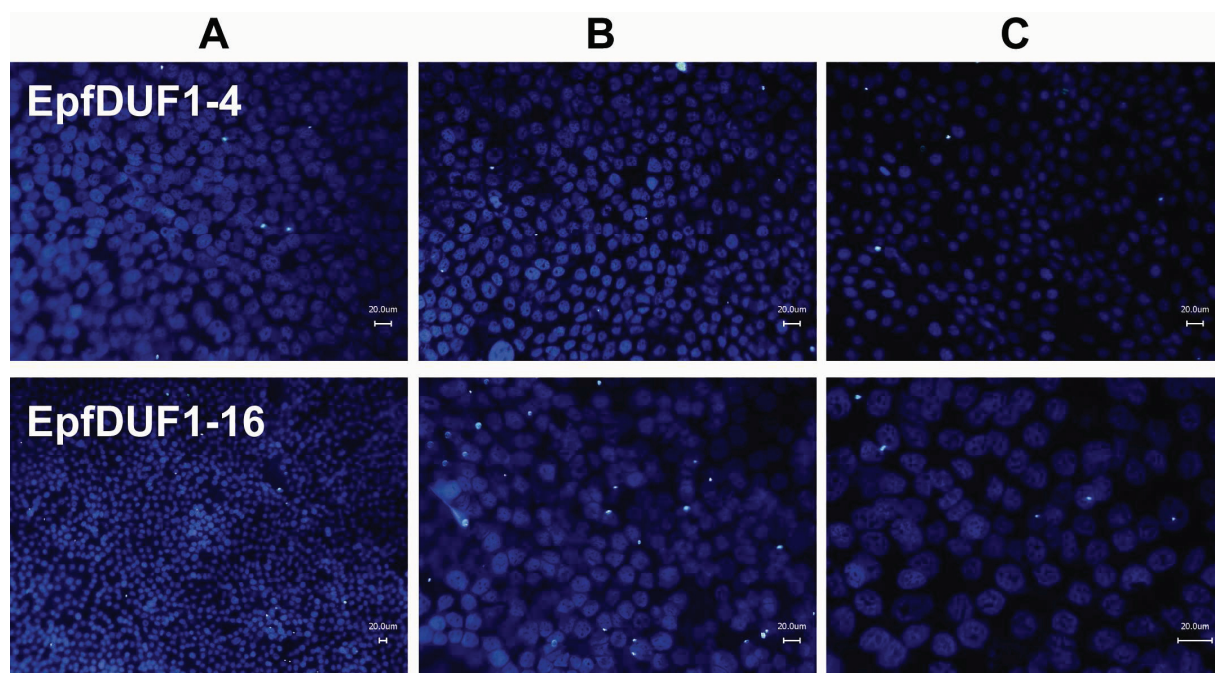


Abbildung 3.14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EpfDUF1-4 und EpfDUF1-16-beschichteten grün-fluoreszierenden Beads an HEp-2-Zellen nach 2 h Infektion. (A) Unbehandelte Zellen infiziert mit unbehandelten Beads. (B) Unbehandelte Zellen mit Epf-beschichteten Beads. (C) Plasminogen-behandelte Zellen mit Epf-beschichteten Beads.

Tabelle 3.5: Kalkulation der Beads/HEp-2-Zelle für die Proteine EpfDUF1-4 und EpfDUF1-16.

Protein	Beadsbehandlung/Zellbehandlung	Anzahl der Beads/Zelle	<i>p</i>
EpfDUF1-4	unbehandelt/unbehandelt	$0,0508 \pm 0,0021$	-
	EpfN/unbehandelt	0.008 ± 0.006	0,076
	EpfN/Plasminogen	$0,002 \pm 0,081$	0,068
EpfDUF1-16	unbehandelt/unbehandelt	$0,0508 \pm 0,0021$	-
	EpfN/unbehandelt	0.040 ± 0.038	0,712
	EpfN/Plasminogen	$0,022 \pm 0,221$	0,076

Mit den Beads-basierenden Versuchen wurde gezeigt, dass Epf ein bakterielles Adhäsins ist.

3.2 Die Rolle von Plasminogen in der GAS M49 Virulenz

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Plasminogenbindung durch *S. pyogenes* Serotyp M49 hinsichtlich der Infektion humaner Zellstrukturen zu untersuchen. Plasminogen ist ein Glycoprotein, welches im humanen Plasma vorkommt (Dano et al., 1985a). Gruppe A Streptokokken können Plasminogen einerseits direkt und andererseits indirekt, über die Bindung von Fibrinogen und anschließend Plasminogen, binden (Lottenberg et al., 1992b). Für die direkte Bindung von Plasminogen sind u.a. verantwortlich: GAPDH (Broder et al., 1991; Pancholi and Fischetti, 1992), SEN (Pancholi and Fischetti, 1998), PAM (Berge and Sjöbring, 1993) und Prp (Sanderson-Smith et al., 2007). Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf die Beobachtung, das Plasminogen Wirtszelladhärenz vermittelt. Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden (i) wie die Wirtszelladhärenz vermittelt wird, (ii) welche Wirtszellrezeptoren dafür verantwortlich sind und (iii) welche intrazellulären Signalwege die Internalisierung von GAS ermöglichen.

3.2.1 Plasminogenbindung von GAS

Zunächst wurden unterschiedliche klinische GAS-Isolate im Plasminogen-Bindungs-Assay getestet. Dazu wurden Bakteriensuspensionen in 1x PBS mit 2 µg/ml Plasminogen für 1 h bei 37 °C bebrütet. Nach dem Waschen der Bakterien wurden diese mit einer Plasmin-Substrat-Lösung inkubiert und anschließend der Umsatz von Plasminogen zu Plasmin bei einer OD von 405 nm im Spektralphotometer verfolgt. Als Negativkontrolle wurden die Bakterien in 1xPBS ohne Plasminogenzusatz inkubiert. Abbildung 3.15A zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

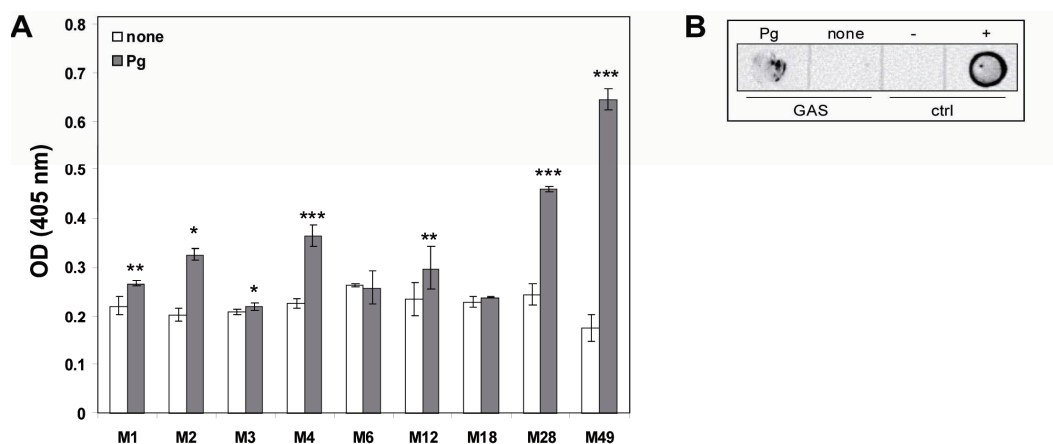


Abbildung 3.15: Oberflächenassoziierte enzymatische Aktivität von Plasmin in unterschiedlichen GAS Serotypen (A) und Dot-Blot-Analyse von GAS M49 (B). none, unbeschichtet; Pg, Plasminogen-beschichtet. (U-Test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Die Serotypen M1, M2, M4, M28 und M49 zeigten hohe Plasminaktivität auf ihren Oberflächen. Da GAS M49 die höchste gemessene Aktivität vorwies und um das oberflächengebundene Plasminogen nachzuweisen, wurde eine Dot-Blot-Analyse mit diesem Serotyp durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien mit Plasminogen inkubiert, anschließend mehrfach gewaschen und auf die PVDF-Membran aufgetropft. Die Detektion von Plasminogen erfolgte mit monoklonalem anti-PLG-Antikörper (Sigma) nach Herstellerangaben. Das Ergebnis der Untersuchung ist in der Abbildung 3.15B dargestellt. Es sind eindeutige Signale bei plasminogenbeschichteten Bakterien und der Positivkontrolle (+; Plasminogen selbst) zu sehen. Bei der Negativkontrolle (-; Fibronektin) und den unbeschichteten Bakterien sind keine Signale zu erkennen. Alle weiteren Versuche wurden mit GAS M49 durchgeführt.

3.2.2 Oberflächen-gebundenes Plasminogen verstärkt GAS M49 Adhärenz und Internalisierung

Die Bindung von Plasminogen ermöglicht GAS das Adhären an Wirtszellen. Dieses Phänomen wurde u.a. für die Adhärenz an Detroit562-Zellen beschrieben (Pancholi et al., 2003). Da GAS M49 ein Isolat aus einer Hautinfektion ist, wurde in diesem Versuch der Einfluss der Plasminogenbindung auf die Adhärenz an und Internalisierung in die humane Keratinocytenzelllinie HaCaT untersucht. Dazu wurde eine definierte Anzahl von Bakterien für 30 min bei RT im Zellkulturmedium ohne FKS mit und ohne Plasminogen inkubiert und anschließend die HaCaT-Zellen nach in 2.12.1 beschriebenem Protokoll behandelt. Um sicher zu gehen, dass die Effekte Plasminogen- und nicht Plasmin-vermittelt sind, wurde in den Parallelversuchen mit Plasmininhibitoren, wie Aprotinin und $\alpha 2$ -Antiplasmin, gearbeitet. Das Ergebnis der Untersuchungen ist in der Abbildung 3.16. dargestellt.

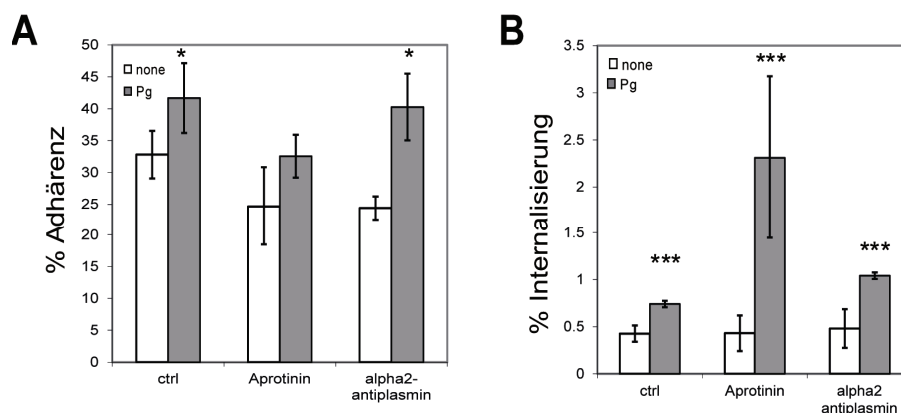


Abbildung 3.16: Adhärenz (A) und Internalisierung (B) des GAS M49 Wildtypstammes an bzw. in HaCaT-Zellen mit (Pg) und ohne (none) Plasminogenbehandlung. (U-Test; * $p < 0,05$, * $p < 0,001$; $n = 5$).**

Die in der Abbildung 3.16 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Beschichtung von GAS M49 mit Plasminogen sowohl zur signifikant erhöhten Adhärenz an als auch Invasion in humane Keratinocyten führt. Durch das Einsetzen plasminspezifischer Inhibitoren konnte eine Plasmin-vermittelten Adhäsion und Internalisierung ausgeschlossen werden.

3.2.3 Inhibition der Plasminogen-vermittelten Adhärenz und Internalisierung durch Heparin

Um die Spezifität der Interaktion zwischen Plasminogen-beschichteten GAS und den Wirtszellen zu untersuchen, wurden als nächstes Inhibitionsversuche durchgeführt. Serrano und Kollegen (Serrano et al., 1996) beschrieben Heparin als einen potentiellen Hemmer von Plasminogen. Aus diesem Grund wurden die Plasminogen-beschichteten und unbeschichteten Streptokokken für 15 min bei RT mit Heparin inkubiert und mit 1xPBS mehrfach gewaschen. Anschließend wurden Standard-Adhärenz- und Internalisierungs-Assay und Plasmin-Aktivitätsmessung durchgeführt. Abbildung 3.17 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen.

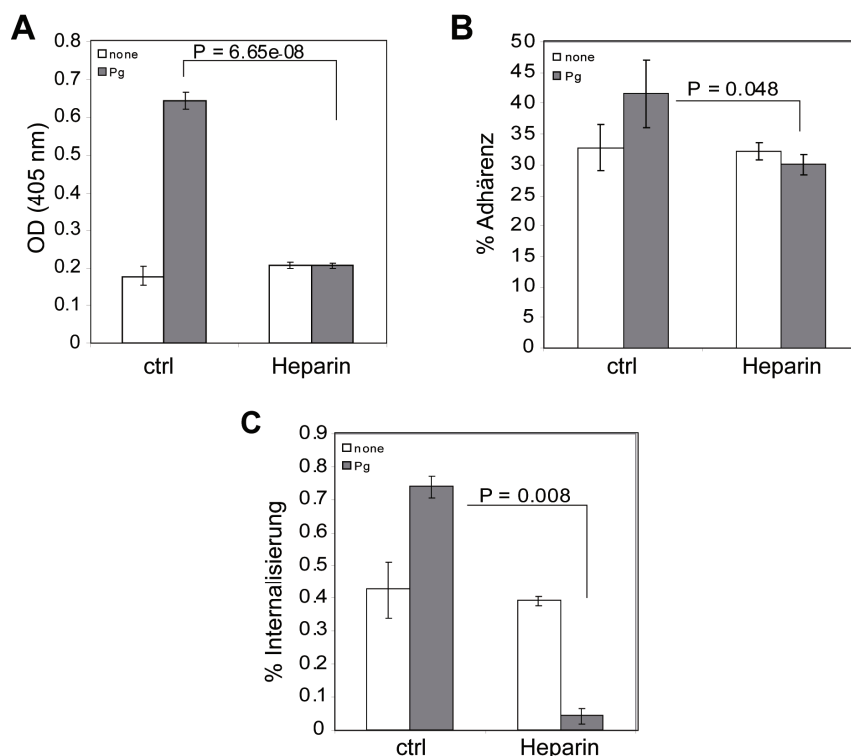


Abbildung 3.17: Einfluss von Heparin auf die Plasminaktivität an der Oberfläche von GAS (A) und Adhärenz (B) und Internalisierung (C) der Bakterien. none, unbeschichtet; Pg, Plasminogen-beschichtet. (n = 5).

Wie der Abbildung 3.17A entnommen werden kann, hemmt Heparin die Plasminaktivität an der Oberfläche der Bakterien. Das hat zur Folge, dass die Plasminogen-vermittelte Adhärenz (Abb. 3.17B) auf den Level der unbeschichteten Bakterien absinkt und die Internalisierung (Abb. 3.17C) sogar unter das Niveau der unbeschichteten Bakterien sinkt.

3.2.4 Integrin-Plasminogen vermittelte Invasion

Aus der Literatur ist bekannt, dass immobilisiertes Plasminogen über Integrine mit U937-Zellen, HEK-Zellen und Neutrophilen interagieren kann (Chavakis and Preissner, 2005; Lishko et al., 2004). Es ist ebenfalls beschrieben, dass der Urokinase-ähnliche Plasminogen-Aktivator (uPA) über die Kringle-Domäne die Subklassen der Integrine, wie α_1 , α_5 und β_1 , binden kann (Wei et al., 2001; Wei et al., 2005). uPA ist verantwortlich für die (i) Regulierung der Fibrinolyse, (ii) perizelluläre Proteolyse und (iii) Regulierung der intrazellulären signalvermittelten Zelladhäsion und Proliferation (Chapman, 1997). Da Plasminogen ebenfalls Kringle-Domänen in seiner Struktur enthält, wurde zunächst ein Sequenz-Vergleich zwischen uPA-, tPA- und Plasminogen-Kringle-Domänen durchgeführt. Die Homologie der Sequenzen lag zwischen 42 und 55,5 %. Das war der erste Hinweis auf mögliche Bindungspartner für Plasminogen an der eukaryoten Zelloberfläche.

Da HaCaT-Zellen eine Reihe von Integrinen auf ihrer Oberfläche exprimieren (Takada et al., 2007), wurden Inhibitionsversuche mit rekombinanten Integrinen $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, und $\alpha_v\beta_5$ durchgeführt. Dazu wurden die unbeschichteten und Plasminogen-beschichteten GAS M49 15 min bei RT inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde der Adhärenz- und Internalisierungs-Assay durchgeführt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.18 dargestellt.

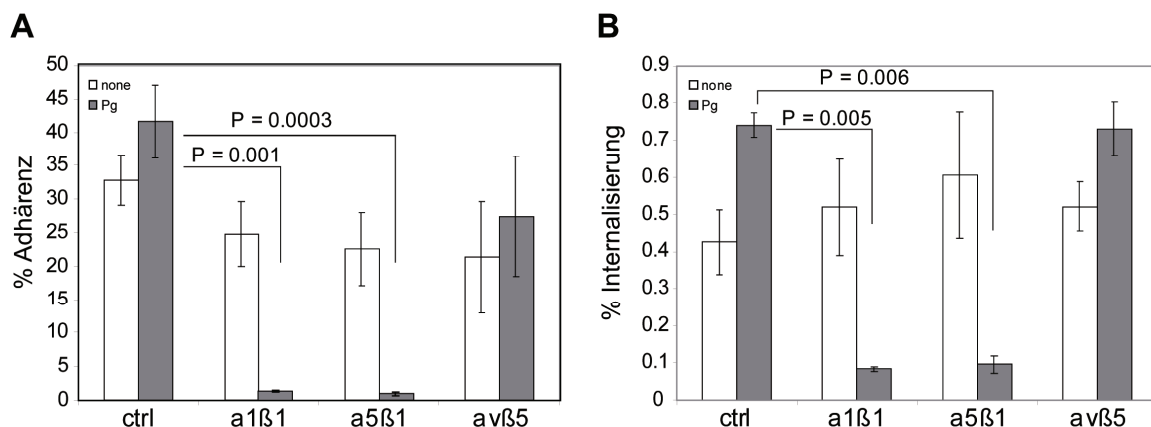


Abbildung 3.18: Integrin-abhängige, Plasminogen-vermittelte Adhärenz an (A) und Internalisierung in (B) humane Keratinozyten. none, unbeschichtet; Pg, Plasminogen-beschichtet. (n = 5).

Sowohl die Adhärenz (Abb. 3.18A) als auch die Internalisierung (Abb.3.18B) in Gegenwart von $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen, sind signifikant vermindert. Nach der Inkubation von Bakterien mit $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen konnten keine Veränderungen im Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von GAS M49 festgestellt werden. Aus der Abbildung 3.18 geht hervor, dass $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Integrine für die Plasminogen-vermittelte Wirtszelladhärenz und Internalisierung, als Wirtszellrezeptoren, verantwortlich sind.

3.2.5 Reduktion der Plasminogen-vermittelten Internalisierung durch genetischen Knock-down von ILK

ILK ist eine Serin-Threonin-Kinase, die mit den cytoplasmatischen Domänen der β -Integrine interagiert. Damit ist diese Kinase eine entscheidende Komponente in den Integrin-vermittelten, intrazellulären Signalwegen (Hannigan et al., 1996; Persad and Dedhar, 2003b). Um den tatsächlichen Plasminogen-Integrin-Internalisierungsweg der Streptokokken in die humanen Keratinozyten nachzuweisen, wurde mittels ILK-siRNA-Transfektion die ILK-Genexpression reduziert. Im Parallelansatz wurden die HaCaT-Zellen mit SignalSilence Control siRNA (Cell Signalling Technology) behandelt. Der Nachweis der verminderten ILK-Expression ist in der Abbildung 3.19A dargestellt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit den in der Tabelle 2.2 aufgelisteten Antikörpern. Wie der Abbildung 3.19A zu entnehmen ist, konnte in den Keratinozyten eine verminderte Menge an ILK nachgewiesen werden. Zur Kontrolle, dass gleiche Mengen an Lysaten aufgetragen wurden, erfolgte der Nachweis der GAPDH-Proteinmenge. Sowohl in transfizierten als auch in nicht-transfizierten Zellen konnten identische Mengen an GAPDH detektiert werden.

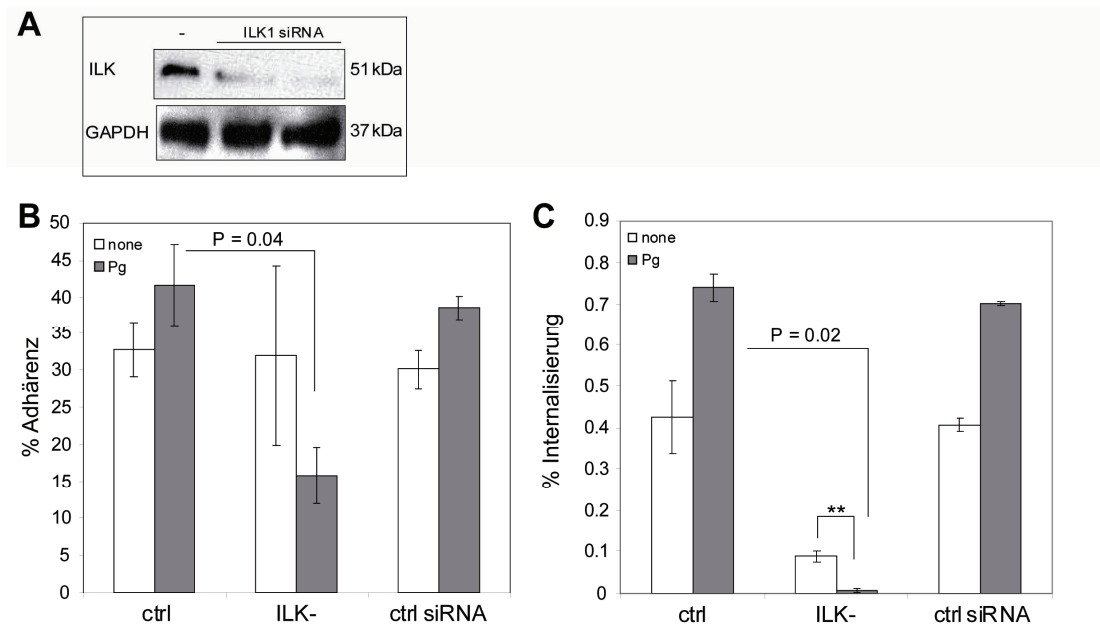


Abbildung 3.19: (A) Nachweis der limitierten ILK-Expression mittels Western-Blot-Analyse. ILK wurde detektiert mit anti-ILK1-Antikörper, GAPDH mit GAPDH-Antikörper (Negativkontrolle). **(B) Adhärenz an und Internalisierung (C) in transfezierte Keratinocyten.** none, unbeschichtet; Pg, Plasminogen-beschichtet. (U-Test; ** $p < 0,01$; $n = 5$).

Mit den ILK1-siRNA-behandelten HaCaT-Zellen wurde ein Adhärenz- und Invasions-Assay mit unbeschichteten und Plasminogen-beschichteten Bakterien durchgeführt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.19B und C dargestellt. Die Adhärenz der Plasminogen-beschichteten GAS an ILK⁻-Zellen ist signifikant vermindert. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Invasion sowohl bei unbeschichteten als auch beschichteten Bakterien vermindert, jedoch ist der Unterschied zwischen den Plasminogen-tragenden und nicht-tragenden Streptokokken signifikant. Die Adhärenz an und Internalisierung in Control siRNA-transfezierte HaCaT-Zellen ist nicht betroffen.

3.2.6 Einfluss des ILK-Signalweges auf die Plasminogen-vermittelte Invasion

ILK, als zentrales Molekül der Integrin-vermittelten Internalisierung von Bakterien in die Wirtszellen, wird direkt von PI3K reguliert (Delcommenne et al., 1998b). PI3K und ILK regulieren die Phosphorylierung von Akt (Persad and Dedhar, 2003b). Um die ILK-abhängige Internalisierung der Bakterien in die HaCaT-Zellen auch downstream von ILK nachzuweisen, wurden die o.g. Enzyme mit kommerziell erworbenen, chemischen Inhibitoren Wortmannin (WM) und Akt 1/2 Kinase-Inhibitor (Akt) gehemmt. Dazu wurden die Keratinozyten 30 min vor Infektion mit den entsprechenden Inhibitoren vorbehandelt und anschließend der Adhärenz-

und Internalisierungs-Assay in Gegenwart dieser durchgeführt. Die Phosphorylierung von Akt wurde mittels einer *Western-Blot* Analyse der Rohextrakte bestimmt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.20A dargestellt. Sowohl bei Behandlung der Keratinozyten mit Akt-Inhibitor, als auch mit WM (30 und 150 min nach Infektion), sind die Mengen an phosphoryliertem Akt deutlich reduziert im Vergleich zur Kontrolle (0 min). Die Akt-Menge selbst war nicht betroffen. Die Analyse von GAPDH zeigt, dass gleiche Mengen der Zelllysate aufgetragen wurden.

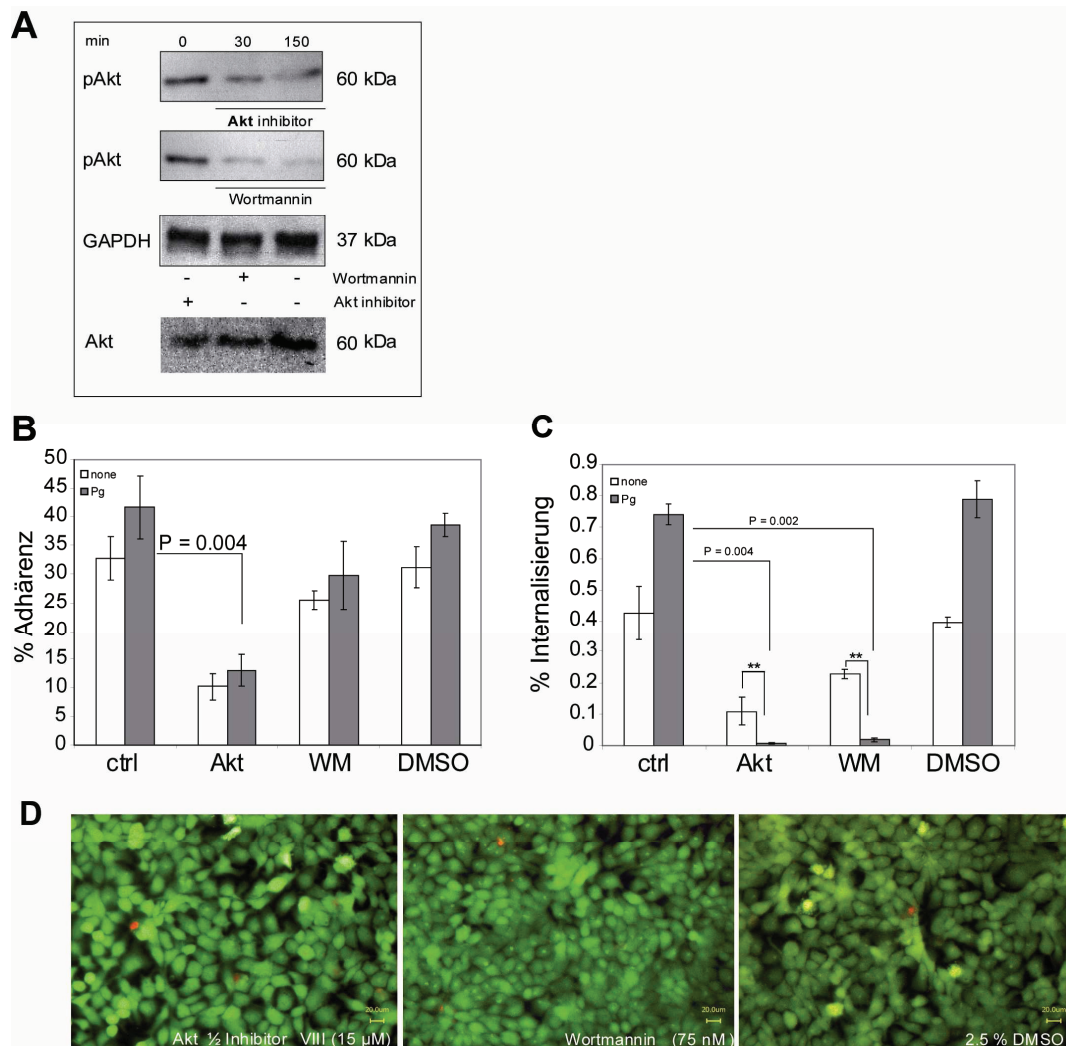


Abbildung 3.20: (A) Analyse der Phosphorylierung von Akt (pAkt) 30 und 150 min nach Infektion. (B) Plasminogen-vermittelte Adhärenz an und (C) Internalisierung in humane Keratinozyten während der Behandlung von Zellen mit WM (75 nM), Akt (15 µM) oder DMSO (2,5 %) (n = 5). (D) Fluoreszenzmikroskopische Überprüfung der Vitalität (LIVE/DEAD) der HaCaT-Zellen nach der Behandlung mit den Inhibitoren. none, unbeschichtet; Pg, Plasminogen-beschichtet.

In der Gegenwart von Akt-Inhibitor ist die Adhärenz von unbeschichteten und Plasminogen-beschichteten Streptokokken reduziert (Abb. 3.20B). Aus den Internalisierungsversuchen

geht hervor, dass sowohl die beschichteten als auch die unbeschichteten GAS eine im Vergleich zur Kontrolle (ctrl) verminderte Internalisierung aufweisen, jedoch ist der Unterschied zwischen Plasminogen-tragenden und nicht-tragenden Bakterien bei der Behandlung der Zellen mit Akt-Inhibitor oder WM signifikant (Abb. 3.20C). Da beide Inhibitoren in DMSO gelöst sind, wurden Kontrollversuche in Gegenwart von DMSO durchgeführt. Zur Kontrolle, dass die beobachteten Effekte nicht durch das Absterben der Keratinozyten bedingt sind, wurden die HaCaT-Zellen einer Leben-Tod-Färbung nach einer 150 minütigen Behandlung mit Akt, WM oder DMSO unterzogen. Wie der Abbildung 3.20D zu entnehmen ist, haben die eingesetzten Reagenzien keinen Einfluss auf die generelle Vitalität der Zellen.

3.2.7 Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die GAS M49 Invasion

ILK ist nicht nur an den Integrin-vermittelten Signaltransduktionswegen beteiligt, sondern ist auch eine strukturelle und katalytische Einheit, die an der Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist (Hannigan et al., 1996; Persad and Dedhar, 2003b). Um die Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts an der Plasminogen-vermittelten GAS M49 Invasion der HaCaT-Zellen zu untersuchen, wurde der Standard Adhärenz und Internalisierungs-Assay mit chemischen Inhibitoren Cytochalasin D (CytoD) und Latrunculin B (LatB) durchgeführt. Beide hemmen die Aktin-Polymerisation.

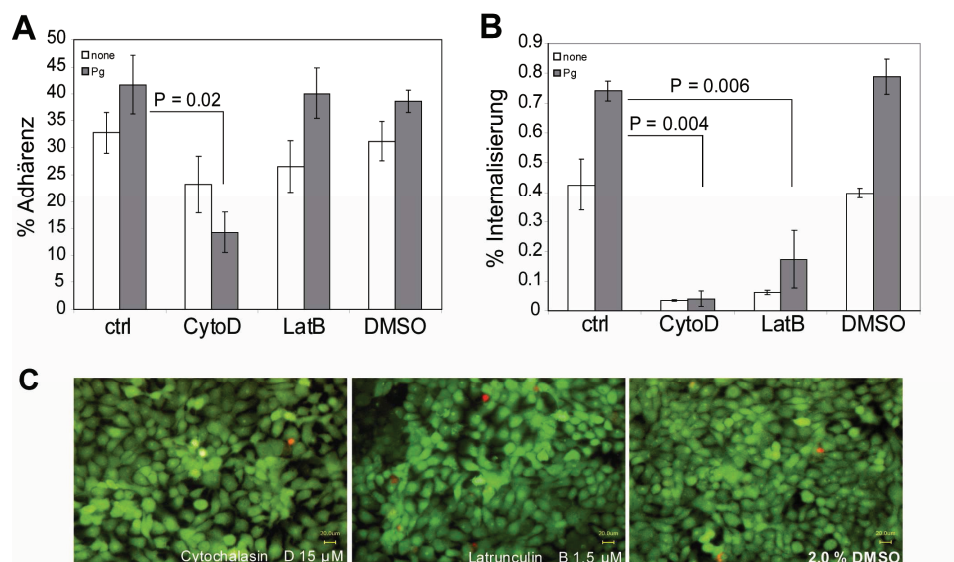


Abbildung 3.21: (A) Plasminogen-vermittelte Adhärenz an und (B) Internalisierung in humane Keratinozyten während der Behandlung von Zellen mit CytoD (15 µM), LatB (1,5 µM) oder DMSO (2 %) (n = 5). (C) Fluoreszenzmikroskopische Überprüfung der Vitalität (LIVE/DEAD) der HaCaT-Zellen nach der Behandlung mit den Inhibitoren. none, unbeschichtet; Pg, Plasminogen-beschichtet.

Aus der Abbildung 3.21A geht hervor, dass CytoD die Adhärenz von GAS grundsätzlich blockiert, während LatB keinen Einfluss auf diesen Vorgang hat. Jedoch ist die Internalisierung (Abb. 3.21B) in Gegenwart von beiden Inhibitoren, sowohl bei Plasminogen-beschichteten als auch unbeschichteten GAS, signifikant vermindert. Um zu kontrollieren, dass die beobachteten Effekte nicht durch das Sterben der Keratinozyten bedingt sind, wurden die HaCaT-Zellen einer Leben-Tod-Färbung nach einer 150 minütigen Behandlung mit LatB, CytoD oder DMSO unterzogen. Wie der Abbildung 3.21C zu entnehmen ist, haben die eingesetzten Reagenzien keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

3.2.8 Überlebensrate der Bakterien in Blut und Makrophagen

In den oben beschriebenen Versuchen wurde nachgewiesen, dass GAS M49 Plasminogen bindet und als Brücke, um an die humanen Keratinozyten zu adhären, nutzt. Sind die Bakterien intrazellulär lokalisiert, können sie dort verbleiben oder weiter in den Blutstrom gelangen. Welche Rolle Plasminogenbindung in der Überlebensfähigkeit der Bakterien im Humanblut spielt, wurde hier untersucht. Die unbeschichteten GAS wiesen nach 3 h im Blut einen Multiplikationsfaktor von $47,45 \pm 10,05$ auf. Die Plasminogen-beschichteten zeigten einen Multiplikationsfaktor von $70,04 \pm 17,2$ ($n = 5$). Dieser Unterschied ist zwar nicht signifikant, lässt aber eine Tendenz erkennen. Das Binden von Plasminogen erhöht die Überlebensrate der Bakterien im Blut.

Im Blut zirkulieren u.a. Monocyten, die im Knochenmark gebildet werden. Stoßen diese auf eine Infektion, sind sie in der Lage sich zu Makrophagen zu differenzieren. Zusätzlich zu den Blutversuchen, wurde in dieser Arbeit die Fähigkeit muriner Makrophagen, Plasminogen-beschichtete und unbeschichtete GAS zu töten, bestimmt. Während nur 28,8 % ($\pm 12,1$) der Plasminogen-tragenden Bakterien getötet wurden, konnten die Makrophagen 51,1 % ($\pm 8,1$) der unbeschichteten GAS vernichten. Dieser Unterschied ist signifikant ($p = 0,015$).

4. Diskussion

4.1. Einordnung von Ralp3 in das Virulenz-assoziierte regulatorische Netzwerk von *S. pyogenes* M49

Streptococcus pyogenes, ein ausschließlich humanpathogenes Bakterium, verursacht eine Reihe von Krankheiten, die entweder milden Verlauf, wie bei Impetigo, nehmen können oder bei Infektion mit bestimmten Serotypen zu generalisierten Infektionen mit anschließender Sepsis oder Nekrose führt (Bisno et al., 2003; Carapetis et al., 2005; Cunningham, 2000). Die Fähigkeit zahlreiche Krankheiten auszulösen ist mit der Expression verschiedener Virulenzfaktoren assoziiert. Die koordinierte Regulation der Expression dieser Virulenzfaktoren ist für den Verlauf der Pathogenese von entscheidender Bedeutung. Die komplexe Regulation der Expression wird durch stand-alone-Regulatoren und Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme erzielt (Parkinson and Kofoed, 1992). Die am längsten bekannten und bisher am besten untersuchten stand-alone-Regulatoren, die globalen Positivregulatoren Mga und RofA, sind mit assoziierten Virulenzgenen in distinkten genomischen Regionen, auch Pathogenitätsinseln genannt, organisiert.

Mga ist ein wichtiger Faktor der Virulenzkontrolle im exponentiellen Wachstum von *S. pyogenes* (Kreikemeyer et al., 2003b; McIver et al., 1995). Die Expression von Mga ist autoreguliert und wirkt direkt und indirekt positiv auf mehrere Virulenzgene und Stoffwechselgene (Ribardo and McIver, 2006). Es besteht auch eine transkriptionelle Vernetzung mit den Regulatoren der Ralp-Familie.

Ralp-Regulatoren wurden in vier verschiedenen Formen beschrieben. RofA, auch Ralp1 genannt, und Nra (Ralp2) sind Regulatoren der FCT-Region. FCT-Regionen wurden in neun verschiedenen Zusammensetzungen beschrieben. Nra kommt ausschließlich im FCT-Typ 3 vor (Nakata et al., 2009b). Die Analyse des GAS Serotyp M1 Genoms (Ferretti et al., 2001) führte zur Identifizierung weiterer Ralp-Regulatoren, Ralp3 und Ralp4 (Granok et al., 2000). Beide sind teilweise charakterisiert (Kreikemeyer et al., 2007b; Kwinn et al., 2007b).

Transkriptionsanalysen im Nra-kodierenden FCT-Typ-3 GAS M49 ergaben, dass Nra neben der Regulation der Gene der FCT-Region und zahlreicher anderer Gene auch an der Regulation eines weiteren Regulators beteiligt ist, der ebenfalls der Ralp-Familie zugeordnet werden konnte. Dieser wurde als Ralp3 bezeichnet und ist ein weiteres Mitglied des regulatorischen Netzwerkes in *S. pyogenes* M49 (Kreikemeyer et al., 2007b).

Ralp3 ist mit dem Virulenzfaktor-kodierenden Gen *epf* assoziiert (RE-Genblock) und in den ES-Genblock, der in allen Serotypen lokalisiert ist, integriert. *In silico*-Analysen ergaben die Präsenz von *ralp3*-homologen Genen in den Serotypen M1, M4, M12, M28 und M49. Zusätzlich zum RE-Genblock enthält die ERES-Region dieser Serotypen zwei offene

Leseraster, *spy0566* und *spy0567*, die Homologien zu Transposasen aufweisen (Kreikemeyer et al., 2007b). Auf Grund des Vorhandenseins solcher Transposase-Genfragmente, des signifikant erhöhten GC-Gehaltes und der Abwesenheit des RE-Genblocks in einigen Serotypen, stellt die ERES-Region eine mögliche Pathogenitätsinsel dar (Hacker et al., 1997).

Der initiale Schritt einer Infektion ist die zunächst unspezifische und anschließend spezifische Adhäsion von Bakterien an humane Zielstrukturen (Courtney et al., 2002b; Kreikemeyer et al., 2003a). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass *Ralp3* in die Adhärenz-vermittelten Prozesse involviert ist. In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Adhärenz- und Internalisierungs-Versuche mit den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen an humanen Larynx-Epithelzellen, der HEP-2-Zelllinie, durchgeführt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Δ *ralp3*-Deletionsmutante dabei eine um ca. 45 % verminderte Adhärenz- und eine um ca. 20 % erhöhte Internalisierungsrate (Kreikemeyer et al., 2007a). Da GAS M49 ein Hautisolat ist, sind die HaCaT-Zellen das geeignetere Modell für diese Versuche. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Adhärenz- und Internalisierungsversuche an der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen gegenüber dem Wildtyp eine um 29 % signifikant verminderte Adhärenz und eine um ca. 40 % signifikant verminderte Internalisierung der *ralp3*-Deletionsmutante.

Die Transkriptomdaten unterstützen dieses Ergebnis. Die Transkriptlevel der Gene des Mga-Regulons, außer dem Gen kodierend für die C5A-Peptidase, sind im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert. Betroffen sind *mga* selbst und Gene die u.a. für Fibronectin-bindende Proteine *spy49_1668c* und *sfbX49*, das Kollagen-ähnliche-binde-Protein *scfA* und das M-Protein *emm49* kodieren. Bei den letztgenannten handelt es sich um Oberflächen-assoziierte Proteine, die für die Wirtszelladhärenz verantwortlich sind.

Die Rolle der Fibronectinbindung in GAS-Adhärenz und -Internalisierung wurde in den letzten Jahren sehr genau untersucht und detailliert in der Literatur beschrieben (Fiedler et al., 2010a; Kreikemeyer et al., 1999b; Kreikemeyer et al., 2004c; Kreikemeyer et al., 2004a). Die Repression der Transkription dieser Gene, durch das Fehlen von *Ralp3*, bewirkt eine verminderte Adhärenz und damit verbundene Internalisierung in die Keratinocyten.

Eine weitere mögliche Erklärung für die verminderten Adhärenz- und Internalisierungsraten lieferten die Ergebnisse der Untersuchungen von SpeB. SpeB ist eine Cysteinprotease, die von allen Gruppe A Streptokokken produziert und über Sekretionsporen des Sec-Weges in die Umgebung abgegeben wird (Hytonen et al., 2001). Dabei wird das inaktive 40 kDa Protein nach der Sekretion in eine 28 kDa Protease umgewandelt und diese kann u.a. Matrixproteine, wie z.B. Fibronectin und Vitronectin, auflösen und damit den Bakterien eine verstärkte Invasion des Wirtes ermöglichen (Cunningham, 2000). Die Messung der Kulturüberstände der Δ *ralp3*-Mutante ergab eine um ca. 60 % verringerte SpeB-Aktivität im

Vergleich zum Wildtyp. Dieses Phänomen ist auf die reduzierte Menge der Protease in den Überständen zurückzuführen. Die Micro-Array-Analyse stützt diese Beobachtung. Die Transkriptmengen von *speB* waren in der Mutante signifikant reduziert.

Ein weiteres Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass trotz verminderter Adhärenz und Internalisierung und geringerer SpeB-Aktivität der prozentuale Anteil an vitalen HaCaT-Zellen bei der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp nicht angestiegen ist. Die Anzahl der lebenden Zellen blieb sowohl nach 2, als auch nach 3 und 4 h bei beiden Stämmen vergleichbar. Die Mutante scheint eine aggressivere Vorgehensweise zu haben, jedoch lassen sich aus den Transkriptomdaten keine Erklärungen ableiten.

Des Weiteren konnte mit den Versuchen gezeigt werden, dass, obwohl es sich bei den Zelllinien um Epithelgewebe handelt, die Bakterien in ihrer Virulenz zwischen Schleimhaut und Haut unterscheiden. Da der Effekt des Knock-outs auf die Adhärenz an und Internalisierung in die Keratinozyten deutlicher ausfällt, kann angenommen werden, dass Ralp3 bei der Infektion der Haut eine größere Rolle spielt, als bei Infektionen der Schleimhaut. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass es sich bei beiden untersuchten Zelltypen um permanente Zelllinien handelt, die ggf. nicht mehr unmittelbar mit Primärgewebe vergleichbar sind. Um die Bedeutung von Ralp3 bei der Infektion der entsprechenden Gewebe eindeutig zu charakterisieren, müssten daher in folgenden Arbeiten Versuche im Tiermodell angeschlossen werden. Dafür würden sich das Hu-Skin SCID Maus- und SKH1 Nacktmausmodelle eignen (Luo et al., 2008; Nakata et al., 2009).

Kwinn und Kollegen (Kwinn et al., 2007a) beschrieben Ralp3 im Serotyp M1T1 als einen direkten oder indirekten Repressor der Kapselsynthese. Die Synthese der Hyaluronsäurekapsel ist eine notwendige Strategie um das Bakterium vor der Immunantwort des Wirtes zu schützen (Wessels et al., 1991) und in septischen Krankheitsverläufen die Überlebensfähigkeit der Bakterien in humanem Blut zu gewährleisten. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen signifikante Unterschiede im Überlebensverhalten zwischen *S. pyogenes* M49 (591)-Wildtyp und der *ralp3*-Mutante. Die *ralp3*-Deletionsmutante, mit einem Multiplikationsfaktor von 0,16, überlebt im humanen Blut nicht. Das heißt im Gegensatz zum Wachstum im Komplexmedium ist ein eindeutiger Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp im humanen Vollblut zu verzeichnen, was Ralp3 als einen GAS Virulenz/Pathogenitäts-assoziierten Transkriptionsregulator charakterisiert. Um den Einfluss der zellulären Bestandteile des Blutes auf das Überleben der Bakterien auszuschließen, wurde der Überlebensversuch in Humanserum ebenfalls durchgeführt. Auch hier zeigte die *ralp3*-Mutante kein Überleben. Der Multiplikationsfaktor lag erneut unter Faktor 1.

Im Einklang mit diesen Beobachtungen wurde bei der Bestimmung des Hyaluronsäureanteils in der Kapsel der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante ein marginal signifikant verminderter Hyaluronsäuregehalt festgestellt. Zudem zeigte die Transkriptomanalyse signifikant

verminderte Transkriptmengen des *emm49*-Gens, welches für das antiphagozytär-wirkende M-Protein kodiert, und des gesamten *sal*-Operons. SalY, ein Protein welches im *sal*-Operon kodiert wird, ist u.a. für das intrazelluläre Überleben von GAS in Makrophagen verantwortlich (Phelps and Neely, 2007). Da beide Gene eine verminderte Transkriptionsrate aufweisen, kann dieses zum beobachteten Phänotyp geführt haben. Zusätzlich ist die Transkription des Virulenzregulator-kodierenden Gens *mga* in der *ralp3*-Deletionsmutante reprimiert. Mga reguliert im GAS Serotyp M1 auch die Transkription von *hasA*, welches für die Kapselsynthese verantwortlich ist (Podbielski et al., 1996). Jedoch wurden dort umgekehrte Effekte beobachtet. Während in der hier vorgelegten Analyse in M49 Ralp3 sich als ein Transkriptionsaktivator von *hasA* herauskristallisiert hat, wurde im GAS Serotyp M1 eine um 400 % erhöhte Transkription des *hasA*-Gens in der Mutante festgestellt (Kwinn et al., 2007a), was einen umgekehrten Schluss nach sich zieht. Im Serotyp M1 ist Ralp3 ein Repressor der Kapselsynthese (Kwinn et al., 2007a). Dies ist ein Indiz einer Serotyp-spezifischen Regulation durch Ralp3.

Eine weitere Beobachtung dieser Arbeit war es, dass ein Knock-out von Ralp3 zu signifikant verminderten Transkriptmengen der Gene aus den beiden *lac*-Operonen führt. Die Rolle von *lac* in unterschiedlichen Gram-positiven Bakterien ist teilweise untersucht (Burne et al., 1999; Rosey et al., 1991; Rosey and Stewart, 1992; Zeng et al., 2010). Im GAS-Genom sind zwei *lac*-Operone annotiert. Die Organisation der *lac*-Operone ist in der Abbildung 4.1 dargestellt. *Lac2* ist in Carbohydrat-Metabolismus involviert und kodiert für Gene des Tagatose-6-Phosphat-Wegs (Rosey et al., 1991). Für *lac1* wurde zusätzlich eine Virulenz-regulierende Rolle beschrieben (Loughman and Caparon, 2006). Die Verwendung unterschiedlicher Energiequellen aus unterschiedlichen Kohlenstoffverbindungen und die Anpassung an limitierte oder sich ständig verändernde Umwelt des Wirtes ist essentiell für Gruppe A Streptokokken (Loughman and Caparon, 2006). GAS verwenden Glukose als Hauptenergiequelle (van, I and Kessler, 1980). Unterschiedliche Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass die Virulenz des Bakteriums mit der Expression der Gene, die für Zucker-Metabolismus kodieren, eng gekoppelt ist (Loughman and Caparon, 2006; Loughman and Caparon, 2007; Shelburne, III et al., 2007a; Shelburne, III et al., 2007b; Shelburne, III et al., 2008).

LacD1, eine Tagatose-1,6-bis-Phosphat-Aldolase, ist nicht nur an der Regulation des Laktose- und Galaktose-Metabolismus beteiligt, sondern ist auch gleichzeitig ein Sensor für die sich verändernden Bedingungen im Wirt (Loughman and Caparon, 2007). Neben der Produktion von Glyceraldehyd-3-Phosphat kann LacD1 auch direkt an DNA binden und über Protein-Protein- oder Protein-Substrat-Interaktionen die Regulation Virulenz-relevanter Gene beeinflussen. Dieses wurde von Loughman und Kollegen gezeigt (Loughman and Caparon, 2006). Steigt z.B. intrazellulär der Galaktosespiegel in GAS an, bindet das am *speB*-

Promoter DNA-gebundene LacD1 die Galaktose. Dieser Vorgang bewirkt eine Konformationsänderung des Enzyms, was eine Dissoziation der Aldolase von der DNA verhindert. Dadurch kann der Regulator von SpeB nicht binden und es findet keine Transkription von *speB* statt (Loughman and Caparon, 2006). Damit wirkt LacD1 als ein möglicher Repressor von *speB* in *S. pyogenes* HSC5. Dieser Vorgang kann auch in GAS M49 zum beobachteten Phänotyp und Transkriptom geführt haben. Die SpeB-Aktivität der Mutante war um 60 % reduziert, was eine Folge der verminderten Transkription des Gens und damit auch einer verminderten Protein-Sekretion in Kulturüberstand ist.

Eine weitere Beobachtung von Loughman und Kollegen war es, dass durch ein Knock-out von *lacD1* LacD2, welches die gleiche enzymatische Reaktion ermöglicht, diese nicht komplementiert (Loughman and Caparon, 2006; Loughman and Caparon, 2007). Das zeigt, dass beide Operone unabhängig von einander arbeiten und durchaus unterschiedliche Aufgaben hinsichtlich der Virulenz und des Metabolismus haben können.

Da beide *lac*-Operone an der Verwertung von Zuckern als Kohlenstoffquelle beteiligt sind und in der $\Delta ralp3$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant herunterreguliert sind, wurde in Rahmen dieser Arbeit die Fähigkeit der Bakterien unterschiedliche C-Quellen zu verstoffwechseln getestet. Von 190 getesteten Carbohydraten war es dem GAS M49 Wildtyp und der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante möglich, 20 C-Quellen zu verstoffwechseln. 3-O- β -D-Galactopyranosyl-D-Arabinose wurde ausschließlich vom Wildtyp als C-Quelle genutzt. Überraschend zeigte die $\Delta ralp3$ -Mutante ein besseres Wachstum mit α -D-Laktose als Nährstoffquelle. In Rahmen dieser Arbeit konnte der tatsächliche Grund für dieses Phänomen nicht gefunden werden. Fest steht, dass beide Operone Gene für die Enzyme des Tagatose-6-Phosphat-Wegs kodieren. Beide sind in der Mutante reprimiert. Sowohl die Mutante, als auch der M49 Wildtyp konnten D-Galaktose nicht verstoffwechseln. Möglicherweise konnten die Enzyme, die durch das nicht so stark reprimierte *fru*-Operon kodiert werden, die vorhandene Laktose metabolisieren.

Fruktose und Tagatosen haben eine ähnliche Stereometrie. Sie unterscheiden sich lediglich durch die Rotation der Hydroxylgruppe am C₄. Sowohl Fruktose-1,6-bis-Phosphat-Aldolase, als auch Tagatose-1,6-bis-Phosphat-Aldolase haben aktive Zentren, die homolog zu einander sind (Loughman and Caparon, 2006; Loughman and Caparon, 2007), und ähnliche Produkte produzieren: Glyceraldehyd-3-Phosphat (GAP) und Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP). Beides sind Intermediate der Glykolyse. Eventuell ist es der $\Delta ralp3$ -Deletionsmutante möglich einen alternativen Stoffwechselweg einzuschlagen, dessen Regulation im Proteom und nicht im Transkriptom zu finden ist. Damit wäre eine bessere Einbindung der Zwischenprodukte in die Glykolyse gewährleistet.

Neben *ralp3* ist in der ERES-Region auch das Gen lokalisiert, welches für das Epf-Protein kodiert. Eine Funktion von Epf als Oberflächen-assoziiertes, Plasminogen-bindendes Protein

wurde von Kreikemeyer et al. (Kreikemeyer et al., 2007a) vorgeschlagen und mit Adhärenz-ELISAs untermauert. Die *epf*-Insertionsmutante zeigte in diesen ELISAs gegenüber dem Wildtyp eine signifikant verminderte Bindung an immobilisiertes, humanes Plasminogen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten keine direkte Interaktion zwischen Epf und Plasminogen nachweisen, jedoch konnte für das Epf-Protein eine Adhäsionseigenschaft detektiert werden. Die *epf*-Insertionsmutante zeigte bei vier getesteten humanen Epithelzellen eine um mehr als 50 % verminderte Adhärenz an HaCaT-Zellen. Vergleicht man die Ergebnisse der Adhärenzversuche der lebenden Bakterien mit den Versuchen der Epf-beschichteten Beads, so ergibt sich ein widersprüchliches Bild. Die DUF-beschichteten Beads zeigten keine Adhärenz an humane Epithelzellen, die EpfN-gecoateten adhärten an Ca9-22- und HEP-2-Zellen direkt und an Plasminogen-behandelte HaCaT-Zellen. Welche humane Oberflächenstrukturen das EpfN-Protein bindet, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es müsste sich eine strukturelle Analyse der rekombinanten Epf-Proteine anschließen um mögliche Homologien zu anderen bakteriellen Proteinen auf der Strukturebene zu finden.

Epf ist ein einzigartiges Protein, das ausschließlich in den GAS-Serotypen M1, M4, M12, M28 und M49 vorkommt. *S. suis* ist der einzige weitere Vertreter, der ein ähnliches Protein kodiert (Kreikemeyer et al., 2007a), wobei die Funktion des Proteins auch in diesem Organismus bis jetzt nicht beschrieben wurde.

Was ebenfalls durch die DNA-Micro-Array-Analysen nicht bestätigt werden konnte ist die Annahme, dass *epf* von Ralp3 reguliert wird. Zwar lieferten die Plasmin-Aktivitätsmessungen der *ralp3*- und *epf*-Mutante nach Beschichtung dieser mit Plasminogen signifikant verminderte Plasminogenmengen an der Oberfläche, jedoch ist diese Beobachtung nicht auf das bakterielle Transkriptom und nicht auf die Fähigkeit von Epf Plasminogen zu binden zurückzuführen. In dieser Arbeit vorgenommene Transkriptom-Analysen konnten die von Kreikemeyer et al. (Kreikemeyer et al., 2007a) postulierten Regulationswege von Ralp3 (Abbildung 1.4) nicht bestätigen. Laut Kreikemeyer et al. müsste ein Knock-out von Ralp3 zu signifikant verminderten Transkriptmengen an *epf*, *sagA*, *cpa*, *nra*, und signifikant erhöhten an *prtF2* und *msmR* führen (Fiedler et al., 2010b; Kreikemeyer et al., 2007b). Diese Analysen basieren auf *luc*-Reportengenfusionen, deren Aktivitäten im Luciferase-Assay gemessen wurden. Die eben genannten Regulationsmuster lieferte die genomweite Transkriptomanalyse dieser Arbeit nicht. Ralp3, als ein potentieller Virulenzregulator des GAS M49, reguliert die Transkription der Gene des Mga-Regulons, des *sal*- und *lac1*-Operons. Als potentieller Metabolismusregulator reguliert Ralp3 die beiden *lac*-Operone und Teile des *fru*-Operons. Eine Übersicht der Regulationsmuster von Ralp3 in GAS M49 ist in der Abbildung 4.1 dargestellt.

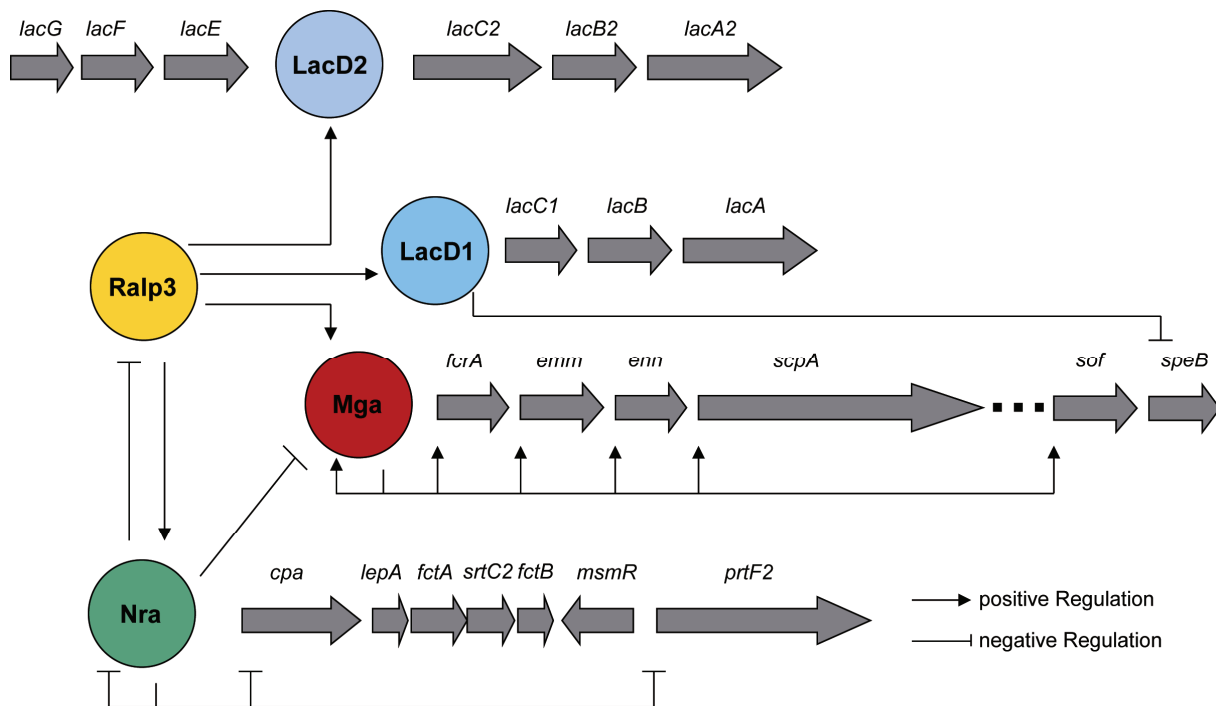


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des regulatorischen Netzwerks von Ralp3 in *S. pyogenes* Serotyp M49 ((Fiedler et al., 2010b) mod.). Genbezeichnungen siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 1.4.

Exemplarisch für nicht-*ralp3*-tragende Serotypen wurde Ralp3 in GAS M2 heterolog exprimiert. Die nachgewiesene Expression von *ralp3* in diesem Serotyp führte zum verminderten Virulenzverhalten. Die M2::*ralp3*-Mutante zeigte signifikant verminderte Adhärenz an und Internalisierung in eukaryote Epithelzellen. Das Wachstum in humanem Blut und Serum war um 2/3 vermindert. Anscheinend übernahm Ralp3 in diesem Serotyp eine Repressor-Funktion.

Da die Transkriptionsregulatoren in unterschiedlichen Serotypen unterschiedliche Regulationsmuster aufweisen, ist schon lange bekannt. Während Ralp3 in Serotyp M1 ein Repressor ist (Kwinn et al., 2007), agiert Ralp3 in Serotyp M49 als Aktivator der Expression Virulenz-kodierender Gene (Kreikemeyer et al., 2007). Für Nra wurden ebenfalls unterschiedliche Regulationen beobachtet. Die Serotypen M49 und M53, die FCT-3-Typ Nra-tragend sind, zeigen auf transkriptioneller Ebene ebenfalls entgegengesetzte Regulationsmuster (Luo et al., 2008). Warum Ralp3 im GAS Serotyp M2 eine Repressor-Rolle angenommen hat, konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch deutet das Virulenzverhalten auf den Verlust des RE-Genblocks im GAS Serotyp M2 hin. Die ERES-Region zählt zu Pathogenitätsinseln. Diese zeichnen sich durch das Vorhandensein von Transposase-Genfragmenten und durch signifikant erhöhten GC-Gehalt (Hacker et al., 1997). Ein weiteres Indiz für eine echte Pathogenitätsinsel ist das Vorkommen oder Nicht-Vorkommen in einigen Serotypen. Da Ralp3 in GAS Serotyp M2 eine Repressorfunktion hat

und damit dem Bakterium einen Nachteil im Viranzverhalten verschafft, könnte dieser Serotyp im Laufe der Evolution den RE-Genblock deletiert haben.

4.2 Plasminogen-vermittelte GAS M49-Invasion der Keratinocyten

S. pyogenes ist fähig spezifisch an eukaryote Zielzellen zu adhären, in diese zu internalisieren und dort für einen längeren Zeitraum zu überdauern (Courtney et al., 2002a; Kreikemeyer et al., 2004b; Molinari and Chhatwal, 1999; Podbielski and Kreikemeyer, 2001). Diese Fähigkeit von GAS ist mit der Expression zahlreicher indirekt oder direkt an Wirtszellen wirkender sezernierter und/oder oberflächenlokalisierter Virulenzfaktoren assoziiert (Fiedler et al., 2010a; Kreikemeyer et al., 2003a). Die Produktion von Adhäsinen ist die Voraussetzung für die erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes und ggf. die anschließende Invasion oder Internalisierung. Diese beiden Prozesse ermöglichen GAS einen initialen Kontakt mit der Wirtszelle. Am besten untersucht ist die Fibronektin-vermittelte Internalisierung von GAS in die humanen Epithelzellen (Cue and Cleary, 1998b; Greco et al., 1995; Jadoun et al., 1998; LaPenta et al., 1994; Molinari et al., 1997). Jedoch spielt nicht nur die Matrixprotein-Bindung eine Rolle bei der Invasion des Wirtes. Zum Beispiel in Wunden der Haut befindet sich Blut, dessen Plasmaproteine eine Reihe von Targets für Oberflächen-Moleküle der Streptokokken bieten. Plasminogen ist eins davon.

Plasminogen ist ein Glykoprotein, welches durch Spaltung zu einer enzymatisch aktiven Serin-Protease Plasmin konvertiert werden kann (Dano et al., 1985b; Ponting et al., 1992b). Es ist bekannt, dass Bindung von Plasminogen die Invasion von GAS in bestimmte Zelltypen ermöglicht und gleichzeitig die Bakterien vor der Immunantwort des Wirtes schützt (Cole et al., 2006; Khil et al., 2003; McArthur et al., 2008; Sanderson-Smith et al., 2008). Die Literatur beschränkt sich ausschließlich darauf, dass die Bindung von Plasminogen eine verstärkte Adhärenz an humane Larynx- und Pharynx-Zellen ermöglicht (Abbot et al., 2007; Jin et al., 2005; Pancholi et al., 2003; Smith et al., 2010). Wie die Bakterien genau in die Zellen internalisieren ist nicht bekannt. Pancholi und Kollegen (Pancholi et al., 2003) beobachteten bei den pharyngealen Epithelzellen eine durch Plasminogen vermittelte perizelluläre Transmigration der Bakterien. Jedoch handelt es sich hierbei nicht um den Internalisierungsvorgang. Welche Wirtsoberflächerezeptoren für die Adhäsion verantwortlich waren, wurde in der Arbeit von Pancholi nicht geklärt.

Um ein geeignetes Modell für eine Plasminogen-vermittelte Wirtsinvasion zu etablieren, wurden zunächst unterschiedliche Serotypen der Gruppe A Streptokokken auf ihre Fähigkeit Plasminogen zu binden untersucht. GAS M49 zeigten die höchste Plasmin-Aktivität auf ihrer Oberfläche. Da *S. pyogenes* Serotyp M49 ein Hautisolat ist und ein Knock-out von *ralp3*

phänotypisch größere Unterschiede im Adhärenz- und Internalisierungsverhalten bei HaCaT-Zellen verursacht hat, wurden die Keratinozyten für das erstellen des Modells ausgewählt. In den nachfolgenden Versuchen wurde festgestellt, dass Plasminogen-beschichtete Bakterien im Vergleich zu unbeschichteten signifikant höhere Adhärenz- und Internalisierungsraten erreichen. Dafür gibt es unterschiedliche Erklärungen. 1.) Das GAS-Oberflächen-gebundene Plasminogen selbst agiert als Brückenmolekül zwischen GAS und Keratinocyten. 2.) Das konvertierte Plasminogen, demnach Plasmin, was an der Oberfläche von Bakterien gebunden ist, agiert als Brückenmolekül zwischen GAS und den HaCaT-Zellen. 3.) Plasmin löst als aktive Serin-Protease die Matrixstrukturen der Keratinocyten auf und ermöglicht damit den Bakterien eine verstärkte Invasion der Zellen. Durch die Verwendung des Breitband-Serin-Protease-Hemmers Aprotinin und einem spezifischen Plasmininhibitor α 2-Antiplasmin konnten die enzymatischen Effekte ausgeschlossen werden. In der Gegenwart beider Inhibitoren zeigten die Streptokokken weiterhin erhöhte Adhärenz- und Internalisierungsraten. Punkt zwei kann teilweise ausgeschlossen werden. Durch das Testen der HaCaT-Zellen alleine und in Kombination mit Bakterien auf ihre Fähigkeit Plasminogen zu Plasmin zu konvertieren, wurde festgestellt, dass diese nicht in der Lage waren Plasminogen zu aktivieren (Abbildung A1C). Zusätzlich wurden die Adhärenz- und Internalisierungsversuche mit der *ska*⁻-Mutante, die keine aktive Streptokinase produzieren kann, durchgeführt. Auch sie zeigte erhöhtes Adhärenz- und Internalisierungsverhalten nach Beschichtung mit Plasminogen (Abbildung A1B). Trotz der gemachten Beobachtungen kann der Einfluss von Plasmin nicht 100 %ig ausgeschlossen werden. Die daraus resultierenden Effekte müssen jedoch minimal sein und aus diesem Grund werden sie bei der Interpretation der Daten vernachlässigt.

Als nächstes wurden die Keratinocytenrezeptoren, die den Bakterien die Plasminogen-vermittelte Adhärenz ermöglichen, identifiziert. Bisher war bekannt, dass das GAS M-Protein an CD46 der Keratinocyten binden kann (Okada et al., 1994; Okada et al., 1995). Diese Bindung konkurriert mit der Hyaluronsäurekapsel, da diese die genannte Interaktion blockiert (Schrager et al., 1996; Schrager et al., 1998). Die Kapsel selbst interagiert mit dem CD44-Rezeptor der Keratinocyten (Schrager et al., 1998). Jedoch vermittelt diese Interaktion ausschließlich die Transmigration der Streptokokken (Cywes and Wessels, 2001) und nicht die Internalisierung. Ebenfalls bekannt ist, dass das SfbI-Protein, welches Fibronektin bindet, und GAS-Pili mit Keratinocyten interagieren können (Abbot et al., 2007; Edwards et al., 2004; Smith et al., 2010). Alle eben genannten Interaktionen sind jedoch Serotyp-spezifisch und treffen nicht auf alle Streptokokken zu (Darmstadt et al., 2000; Oliver et al., 2007; Smith et al., 2010).

Die Fibronektin-vermittelte Adhärenz und damit verbundene Internalisierung kann in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da unter Serum-freien Bedingungen gearbeitet wurde.

Lishko und Kollegen (Lishko et al., 2004) berichteten, dass Plasminogen mittels Integrinen an eukaryote Zellen binden kann. *In silico* Analysen dieser Arbeit zeigten, dass die Kringle-Domänen von Plasminogen zu 42 und 55,5 % homolog zu Kringle-Domänen von uPA und tPA sind. Beide Rezeptoren interagieren mit Integrinen mittels ihrer Kringle-Domänen (Wei et al., 2001; Wei et al., 2005). Aufgrund der Homologien der Aminosäuresequenzen wurden unterschiedliche Integrine als kompetitive Inhibitoren im Adhärenz- und Internalisierungs-Assay eingesetzt. $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Integrine hemmten die Plasminogen-vermittelte Adhärenz von ca. 31 gegen 1 % und dementsprechend auch die Internalisierung der Bakterien. Dieses Ergebnis lässt zwei Rückschlüsse zu. 1.) *S. pyogenes* Serotyp M49 kann nicht über eigene Rezeptoren die getesteten Integrine binden. 2.) Plasminogen bindet $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Integrine, was den Bakterien eine Adhärenz an Keratinocyten ermöglicht. Aus den Studien der Fibronektin-vermittelten Adhärenz und Internalisierung ist bekannt, dass dort Integrine ebenfalls diese Prozesse ermöglichen (Cue et al., 2001; Cue and Cleary, 1998a; Ozeri et al., 1998; Wang et al., 2006). Die zytoplasmatischen Domänen der Integrine sind mit der ILK eng gekoppelt (Wang et al., 2006; Wang et al., 2007). Ein im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter Knock-down der ILK führte zu 50 % verminderten Adhärenz der Plasminogen-beschichteten Bakterien. Die Plasminogen-vermittelte Internalisierung wurde komplett unterdrückt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Internalisierungsvorgänge zwischen beschichteten und unbeschichteten Streptokokken auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. ILK, als zentrales Molekül der Integrin-vermittelten Internalisierung von Bakterien in die Wirtszellen, wird direkt von PI3K reguliert (Delcommenne et al., 1998b). PI3K selbst und ILK regulieren die Phosphorylierung von Akt (Persad and Dedhar, 2003b).

Um die ILK-abhängige Internalisierung der Bakterien in die HaCaT-Zellen auch downstream von ILK nachzuweisen, wurden die o.g. Enzyme mit den kommerziell erworbenen, chemischen Inhibitoren Wortmannin und Akt $\frac{1}{2}$ Kinase-Inhibitor gehemmt. Nur Wortmannin hemmte die Plasminogen-vermittelte Adhärenz von GAS. Beide Inhibitoren konnten die Plasminogen-vermittelte Internalisierung komplett blocken. Diese Versuche bestätigen, dass PI3K ILK auch unter Infektionsbedingungen aktiviert (Delcommenne et al., 1998a) und Akt auch downstream von ILK in diese Prozesse involviert ist (Persad and Dedhar, 2003a). Da ILK auch eine strukturelle und katalytische Einheit des zytoskelettalen Aktin-Aufbaus ist, wurden zusätzlich Versuche mit Inhibitoren Cytochalasin D und Latrunculin B durchgeführt. Beide blockieren die Aktin-Polymerisation. In Gegenwart der Inhibitoren war sowohl die Plasminogen-vermittelte, als auch die Standard-Internalisierung betroffen. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass nur ein stabiles Aktin-Zytoskelett der Zellen generell die Adhärenz und Internalisierung der Bakterien ermöglicht.

Das in dieser Arbeit postulierte Modell der Plasminogen-vermittelten GAS M49-Invasion der Keratinocyten weist einige Ähnlichkeiten mit den Modellen der Fibronektin-vermittelten

Internalisierung. So wurde für den GAS Serotyp M1 eine M-Protein-Fibronektin- $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Internalisierung in pharyngiale Epithelzellen beschrieben (Wang et al., 2006). Ähnliche Internalisierungswege wurden auch für das Streptokokken Oberflächen-assoziierte SfbI-Protein postuliert (Ozeri et al., 1998). Auch für andere humanpathogene Bakterien, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Porphyromonas gingivalis*, wurden direkte und indirekte Integrin-vermittelte Invasionsmechanismen in eukaryote Zellstrukturen beschrieben (Bergmann et al., 2009; Fowler et al., 2000; Yilmaz et al., 2002).

GAS M49 nutzt also Plasminogen als Brücke, um an die humanen Keratinozyten zu adhären. Sind die Bakterien intrazellulär lokalisiert, können sie dort verbleiben oder weiter in den Blutstrom gelangen. Welche Rolle Plasminogenbindung in der Überlebensfähigkeit der Bakterien im Humanblut spielt, wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Die Plasminogen-beschichteten GAS haben nach 3 h im Blut einen höheren Multiplikationsfaktor als die unbeschichteten erreicht. Dieser Unterschied ist zwar nicht signifikant, lässt aber eine Tendenz erkennen. Das Binden von Plasminogen erhöht die Überlebenschance der Bakterien im Blut.

Die im Blut lokalisierten Monocyten differenzieren sich bei bakteriellen Infektionen zu Makrophagen aus und stellen damit eine der ersten Immunabwehrreaktionen der angeborenen Immunantwort des Wirtes dar. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass Plasminogenbeschichtung die Bakterien vor dem Abtöten durch Makrophagen schützt. Die initiale bakteriozide Wirkung von Makrophagen beruht auf einer Phagozyt-Oxidase (Goldmann et al., 2007; Goldmann et al., 2009). Das Binden von Plasminogen scheint die Bakterien vor dieser zu maskieren und ist damit essentiell für das Überleben von GAS M49 im Blut.

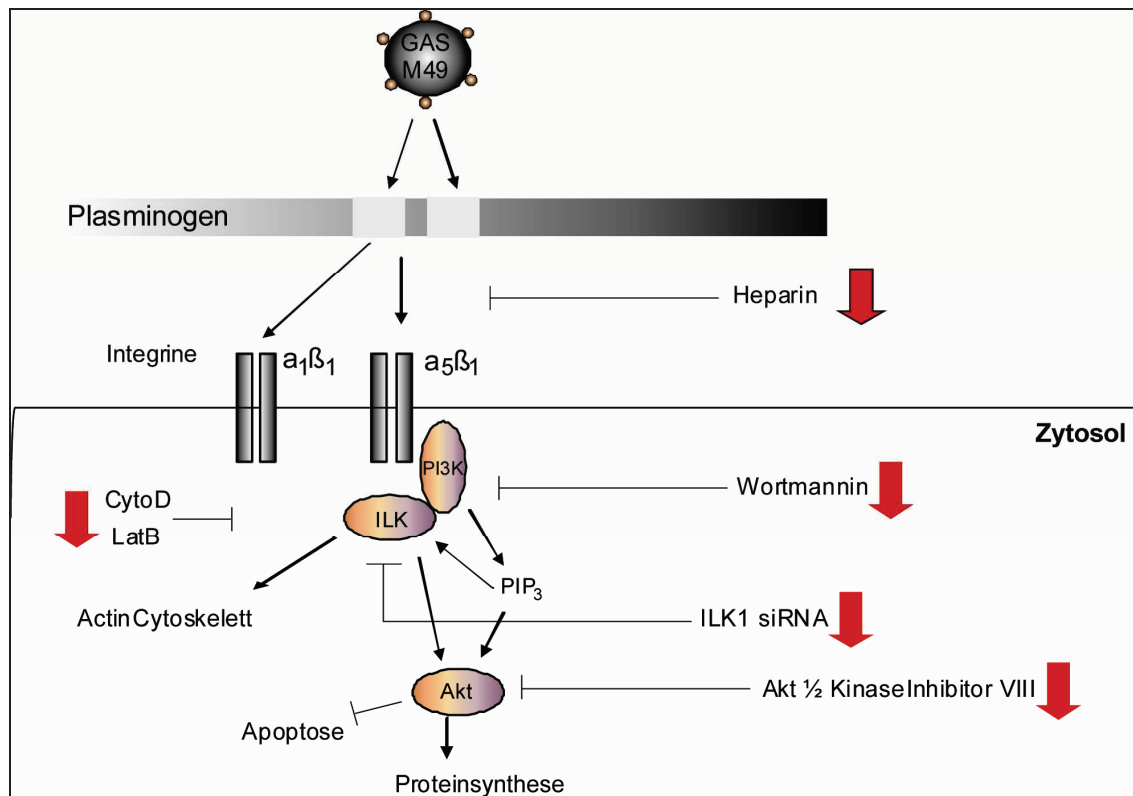


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Plasminogen-vermittelten Keratinocyten-Internalisierung von *S. pyogenes* Serotyp M49 ((Wang et al., 2006) mod.). GAS M49 exprimieren auf ihrer Oberfläche eine Reihe von Plasminogen-bindenden Proteinen. Diese binden Plasminogen aus der Umgebung und nutzen es als Brücke um an $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Integrine zu binden. Dieser Vorgang aktiviert ILK. Die ILK-Aktivierung ist PIP_3 -abhängig. Die direkte Hemmung von ILK durch ein Knock-down oder die indirekte Hemmung durch die Inhibierung von PI3K oder Akt, verhindert die Plasminogen-vermittelte Invasion der Streptokokken. Störung der Actin-Polymerisation durch CytoD oder LatB führen ebenfalls zur verminderten Internalisierung der GAS M49 in die Keratinocyten.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zeigen, dass Plasminogen ein wichtiges Molekül für das extra- und intrazelluläre Überleben von *S. pyogenes* M49 ist. Es verstärkt die Adhärenz an und Internalisierung der Bakterien in die Keratinocyten (Abbildung 4.2), d.h. das Binden von Plasminogen ist entscheidend für das Initiieren der Hautinfektion. Sind die Bakterien an den Keratinocyten gebunden, können sie dank Plasminogen die wirtseigenen intrazellulären Moleküle für sich ausnutzen und damit die Internalisierung einleiten. Intrazellulär lokalisiert haben sie die Möglichkeit in der Zelle zu persistieren oder weiter durch Gewebestrukturen des Wirtes zu wandern. Sind die Bakterien im Blut angekommen, schützt das Plasminogen sie vor Makrophagen und erhöht damit ihre Chancen dort zu überleben.

5. Zusammenfassung

Ralp3-Phänotyp von *S. pyogenes* M49:

1. Inaktivierung von *ralp3* führt zur verminderten Adhärenz an und Internalisierung in humane Keratinocyten.
2. Die Δ *ralp3*-Deletionsmutante ist nicht fähig in Humanblut und -serum zu überleben.
3. *Ralp3* Deletion führt zu vermindertem Hyaluronsäuregehalt der Kapsel in GAS M49.
4. Die Δ *ralp3*-Mutante bindet weniger Plasminogen als der M49 Wildtyp.
5. *Ralp3*-Mutation führt zur verminderten Sekretion von SpeB in die Umgebung.

Ralp3-Transkriptom von *S. pyogenes* M49:

1. Die Transkription von 16 Genen (1,0 %) in der Δ *ralp3*-Deletionsmutante ist signifikant erhöht.
2. 43 Gene (2,5 %) in der Δ *ralp3*-Deletionsmutante zeigen signifikant verminderte Transkriptmengen im Vergleich zum GAS M49 Wildtyp.
3. Die Mehrheit der Gene (59,4 %) zeigte keine Veränderung im Transkript und 37,1 % zeigten unter gewählten Bedingungen keine Treffer oder wurden aufgrund der statistischen Analyse in der Auswertung nicht berücksichtigt.
4. Unter den reprimierten Genen wurde eine Präferenz für ganze Operon-/Regulon-Strukturen festgestellt. U.a. sind Operone, die für Gene mit metabolischer Funktion kodieren, wie z.B. beide *lac*-Operone (*lacABC1D1* und *lacA2B2C2D2EFG*) und *fru*-Operon (*fruAKR*), betroffen. Weiterhin sind Virulenz-kodierende Gene, wie das gesamte Mga-Regulon (*mga*, *emm49*, *ennX*, *sof*, *speB*) herunterreguliert.
5. Mittels qRT-PCR konnte für ausgewählte Gene das Ergebnis der Micro-Array-Analyse bestätigt werden.

Epf als Oberflächen-lokalisiertes Adhäsion:

1. Die Genfragmente *epfN*, *epfDUF1-4* und *epfDUF1-16* konnten mittels PCR amplifiziert, hydrolysiert und in den pASK-IBA2 Vektor ligiert werden.
2. Die entsprechenden Proteine EpfN, EpfDUF1-4 und EpfDUF1-16 konnten heterolog exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt werden.
3. EpfN ist für die Wirtszelladhärenz verantwortlich.
4. Die *epf*-Insertionsmutante zeigte eine verminderte Adhärenz an humane Keratinocyten.

Die Rolle von Plasminogen in GAS M49 Virulenz:

1. Plasminogen verstärkt die GAS M49-Adhärenz an und -Internalisierung in humane Keratinocyten. Diese Vorgänge sind unabhängig von der Konvertierung von Plasminogen zu Plasmin.
2. $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Integrine sind Rezeptoren der Keratinocyten, die diese Adhäsion ermöglichen und die anschließende Internalisierung der GAS M49 einleiten.
3. ILK, als intrazelluläres Enzym der Keratinocyten, bewirkt eine Konformationsänderung der Integrine und damit die Einschleusung von Bakterien in die HaCaT-Zellen. Dieser Vorgang ist PI3K- und Akt-abhängig.
4. Das Blockieren der Aktin-Polymerisation führt zu verminderter GAS-Internalisierung in die Keratinocyten.
5. Das Binden von Plasminogen schützt die Bakterien vor Abtötung durch Makrophagen.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	Aqua
Abb.	Abbildung
ad	lateinisch für „auf“, „zu“
AG	Aktiengesellschaft
AHT	Anhydrotetracyclin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BHI	Brain-Heart-Infusion
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
c	zenti
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
cDNA	komplementäre (copy) DNA
Cl	Chlor
Cpa	collagen-binding protein of group A streptococci
d	Desoxy-
Da	Dalton
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor/in
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERES-Region	<u>eno</u> - <u>ralp3</u> - <u>epf</u> - <u>sagA</u> -Region
<i>et al.</i>	et alteri, lateinisch für „und andere“
Fba	Fibronektin-bindendes Protein

FCT-Region	fibronectin-/collagen-binding, T-Antigen-region
g	Gramm
G	Guanin
GAS	Gruppe A Streptokokken
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
Hpr	Histidin-enthaltendes Phosphocarrier Protein
IS-Element	Insertionselement
k	kilo
K	Kalium
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
l	Liter
lat.	lateinisch
LB	Luria Broth
Lsg.	Lösung
m	Meter, Milli (10^{-3})
M	molar
MCS	Multiple Cloning Site (Multiple Klonierungsstelle)
Mg	Magnesium
Mga	multiple gene regulator of GAS
mind.	mindestens
min	Minute
mod.	modifiziert
mRNA	messenger RNA
MSCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule
MsmR	multiple sugar metabolism regulator
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
N	Stickstoff
Na	Natrium
Ni	Nickel
Nra	negative regulator of group A streptococci
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
P	Phosphor

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAIs	Pathogenitätsinseln
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaktion (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Prof.	Professor/in
PrtF2	Protein F2
PTS	Phosphotransferase-System
Ralp	RofA like proteins
RNA	Ribonukleinsäure
RofA	regulator of fibronectin binding protein in GAS
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
Sfbl	streptococcal fibronectin binding protein class I
SLS	Streptolysin S
SOF	Serumopazitätsfaktor
SpeB	<i>S. pyogenes</i> Exotoxin B
<i>spy</i> -Gene	<i>S. pyogenes</i> -Gene
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
STSS	Streptokokken-assoziiertes toxisches Schocksyndrom
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TEMED	N, N, N', N',-Tetraethylendiamin
THY	Todd Hewitt Yeast
Tm	Schmelztemperatur
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
U	units
u.a.	und andere
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleichend
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

wt	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
%	Prozent
§	Paragraph

6.2 Literaturverzeichnis

Reference List

- Abbot, E.L., Smith, W.D., Siou, G.P., Chiriboga, C., Smith, R.J., Wilson, J.A. et al. (2007) Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cell Microbiol.* **9**: 1822-1833.
- Adam, D., Scholz, H., and Helmerking, M. (2000) Short-course antibiotic treatment of 4782 culture-proven cases of group A streptococcal tonsillopharyngitis and incidence of poststreptococcal sequelae. *J. Infect. Dis.* **182**: 509-516.
- Beall, B., Facklam, R., and Thompson, T. (1996) Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 953-958.
- Berge, A. and Sjöbrink, U. (1993) PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* **268**: 25417-25424.
- Bergmann, S., Lang, A., Rohde, M., Agarwal, V., Rennemeier, C., Grashoff, C. et al. (2009) Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J. Cell Sci.* **122**: 256-267.
- Bessen, D.E. and Kalia, A. (2002) Genomic localization of a T serotype locus to a recombinatorial zone encoding extracellular matrix-binding proteins in *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **70**: 1159-1167.
- Bisno, A.L., Brito, M.O., and Collins, C.M. (2003) Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect. Dis.* **3**: 191-200.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**: 761-771.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Broder, C.C., Lottenberg, R., von Mering, G.O., Johnston, K.H., and Boyle, M.D. (1991) Isolation of a prokaryotic plasmin receptor. Relationship to a plasminogen activator produced by the same micro-organism. *J. Biol. Chem.* **266**: 4922-4928.
- Burne, R.A., Wen, Z.T., Chen, Y.Y., and Penders, J.E. (1999) Regulation of expression of the fructan hydrolase gene of *Streptococcus mutans* GS-5 by induction and carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* **181**: 2863-2871.
- Caparon, M.G. and Scott, J.R. (1991) Genetic manipulation of pathogenic streptococci. *Methods Enzymol.* **204**: 556-586.
- Carapetis, J.R., Steer, A.C., Mulholland, E.K., and Weber, M. (2005) The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect. Dis.* **5**: 685-694.
- Chapman, H.A. (1997) Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 714-724.

Chavakis,T. and Preissner,K.T. (2005) Integrin-mediated leukocyte adhesive interactions: regulation by haemostatic factors. *Hamostaseologie*. **25**: 33-38.

Cleary,P.P. and Cue,D. (2000) High frequency invasion of mammalian cells by beta hemolytic streptococci. *Subcell. Biochem.* **33**: 137-166.

Cole,J.N., McArthur,J.D., McKay,F.C., Sanderson-Smith,M.L., Cork,A.J., Ranson,M. et al. (2006) Trigger for group A streptococcal M1T1 invasive disease. *FASEB J.* **20**: 1745-1747.

Courtney,H.S., Hasty,D.L., and Dale,J.B. (2002a) Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann. Med.* **34**: 77-87.

Courtney,H.S., Hasty,D.L., and Dale,J.B. (2002b) Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann. Med.* **34**: 77-87.

Cue,D., Lam,H., and Cleary,P.P. (2001) Genetic dissection of the *Streptococcus pyogenes* M1 protein: regions involved in fibronectin binding and intracellular invasion. *Microb. Pathog.* **31**: 231-242.

Cue,D.R. and Cleary,P.P. (1998b) High-frequency invasion of epithelial cells by *Streptococcus pyogenes* can be activated by fibrinogen and peptides containing the sequence RGD. *Infect. Immun.* **66**: 4577.

Cue,D.R. and Cleary,P.P. (1998a) High-frequency invasion of epithelial cells by *Streptococcus pyogenes* can be activated by fibrinogen and peptides containing the sequence RGD. *Infect. Immun.* **66**: 4577.

Cunningham,M.W. (2000) Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 470-511.

Cywes,C. and Wessels,M.R. (2001) Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature* **414**: 648-652.

Dano,K., Andreasen,P.A., Grondahl-Hansen,J., Kristensen,P., Nielsen,L.S., and Skriver,L. (1985a) Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* **44**: 139-266.

Dano,K., Andreasen,P.A., Grondahl-Hansen,J., Kristensen,P., Nielsen,L.S., and Skriver,L. (1985b) Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* **44**: 139-266.

Darmstadt,G.L., Mentele,L., Podbielski,A., and Rubens,C.E. (2000) Role of group A streptococcal virulence factors in adherence to keratinocytes. *Infect. Immun.* **68**: 1215-1221.

Delcommenne,M., Tan,C., Gray,V., Rue,L., Woodgett,J., and Dedhar,S. (1998a) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 11211-11216.

Delcommenne,M., Tan,C., Gray,V., Rue,L., Woodgett,J., and Dedhar,S. (1998b) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 11211-11216.

Edwards,M.L., Fagan,P.K., Currie,B.J., and Sriprakash,K.S. (2004) The fibronectin-binding capacity and host cell adherence of *Streptococcus pyogenes* strains are discordant with each other. *Microbes. Infect.* **6**: 1156-1162.

- Facklam, R. and Elliott, J.A. (1995) Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 479-495.
- Ferretti, J.J., McShan, W.M., Ajdic, D., Savic, D.J., Savic, G., Lyon, K. et al. (2001) Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**: 4658-4663.
- Fiedler, T., Kreikemeyer, B., Sugareva, V., Redanz, S., Arlt, R., Standar, K., and Podbielski, A. (2010a) Impact of the *Streptococcus pyogenes* Mga regulator on human matrix protein binding and interaction with eukaryotic cells. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 248-258.
- Fiedler, T., Sugareva, V., Patenge, N., and Kreikemeyer, B. (2010b) Insights into *Streptococcus pyogenes* pathogenesis from transcriptome studies. *Future. Microbiol.* **5**: 1675-1694.
- Fogg, G.C. and Caparon, M.G. (1997) Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of *rofA*. *J. Bacteriol.* **179**: 6172-6180.
- Fowler, T., Wann, E.R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T.J., and Hook, M. (2000) Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell Biol.* **79**: 672-679.
- Goldmann, O., Kockritz-Blickwede, M., Holtje, C., Chhatwal, G.S., Geffers, R., and Medina, E. (2007) Transcriptome analysis of murine macrophages in response to infection with *Streptococcus pyogenes* reveals an unusual activation program. *Infect. Immun.* **75**: 4148-4157.
- Goldmann, O., Sastalla, I., Wos-Oxley, M., Rohde, M., and Medina, E. (2009) *Streptococcus pyogenes* induces oncosis in macrophages through the activation of an inflammatory programmed cell death pathway. *Cell Microbiol.* **11**: 138-155.
- Granok, A.B., Parsonage, D., Ross, R.P., and Caparon, M.G. (2000) The *RofA* binding site in *Streptococcus pyogenes* is utilized in multiple transcriptional pathways. *J. Bacteriol.* **182**: 1529-1540.
- Greco, R., De Martino, L., Donnarumma, G., Conte, M.P., Seganti, L., and Valenti, P. (1995) Invasion of cultured human cells by *Streptococcus pyogenes*. *Res. Microbiol.* **146**: 551-560.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., and Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J. et al. (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**: 91-96.
- Hanski, E. and Caparon, M. (1992) Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**: 6172-6176.
- Hytonen, J., Haataja, S., Gerlach, D., Podbielski, A., and Finne, J. (2001) The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with strepadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Mol. Microbiol.* **39**: 512-519.

Jadoun,J., Ozeri,V., Burstein,E., Skutelsky,E., Hanski,E., and Sela,S. (1998) Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **178**: 147-158.

Jin,H., Song,Y.P., Boel,G., Kochar,J., and Pancholi,V. (2005) Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *J. Mol. Biol.* **350**: 27-41.

Kaufhold,A., Podbielski,A., Baumgarten,G., Blokpoel,M., Top,J., and Schouls,L. (1994) Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**: 19-25.

Khil,J., Im,M., Heath,A., Ringdahl,U., Mundada,L., Cary,E.N., and Fay,W.P. (2003) Plasminogen enhances virulence of group A streptococci by streptokinase-dependent and streptokinase-independent mechanisms. *J. Infect. Dis.* **188**: 497-505.

Kolberg,J., Aase,A., Bergmann,S., Herstad,T.K., Rodal,G., Frank,R. et al. (2006) *Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. *Microbiology* **152**: 1307-1317.

Kreikemeyer,B., Boyle,M.D., Buttaro,B.A., Heinemann,M., and Podbielski,A. (2001) Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol. Microbiol.* **39**: 392-406.

Kreikemeyer,B., Klenk,M., and Podbielski,A. (2004b) The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrix-binding proteins and their regulation. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**: 177-188.

Kreikemeyer,B., Klenk,M., and Podbielski,A. (2004a) The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrix-binding proteins and their regulation. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**: 177-188.

Kreikemeyer,B., Martin,D.R., and Chhatwal,G.S. (1999a) SfbII protein, a fibronectin binding surface protein of group A streptococci, is a serum opacity factor with high serotype-specific apolipoproteinase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 305-311.

Kreikemeyer,B., Martin,D.R., and Chhatwal,G.S. (1999b) SfbII protein, a fibronectin binding surface protein of group A streptococci, is a serum opacity factor with high serotype-specific apolipoproteinase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 305-311.

Kreikemeyer,B., McIver,K.S., and Podbielski,A. (2003b) Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol.* **11**: 224-232.

Kreikemeyer,B., McIver,K.S., and Podbielski,A. (2003a) Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol.* **11**: 224-232.

Kreikemeyer,B., Nakata,M., Koller,T., Hildisch,H., Kourakos,V., Standar,K. et al. (2007b) The *Streptococcus pyogenes* serotype M49 Nra-Ralp3 transcriptional regulatory network and its control of virulence factor expression from the novel *eno ralp3 epf sagA* pathogenicity region. *Infect. Immun.* **75**: 5698-5710.

Kreikemeyer,B., Nakata,M., Koller,T., Hildisch,H., Kourakos,V., Standar,K. et al. (2007a) The *Streptococcus pyogenes* serotype M49 Nra-Ralp3 transcriptional regulatory network and its

control of virulence factor expression from the novel eno ralp3 epf sagA pathogenicity region. *Infect. Immun.* **75**: 5698-5710.

Kreikemeyer,B., Oehmcke,S., Nakata,M., Hoffrogge,R., and Podbielski,A. (2004d) Streptococcus pyogenes fibronectin-binding protein F2: expression profile, binding characteristics, and impact on eukaryotic cell interactions. *J. Biol. Chem.* **279**: 15850-15859.

Kreikemeyer,B., Oehmcke,S., Nakata,M., Hoffrogge,R., and Podbielski,A. (2004c) Streptococcus pyogenes fibronectin-binding protein F2: expression profile, binding characteristics, and impact on eukaryotic cell interactions. *J. Biol. Chem.* **279**: 15850-15859.

Kulisek,E.S., Holm,S.E., and Johnston,K.H. (1989) A chromogenic assay for the detection of plasmin generated by plasminogen activator immobilized on nitrocellulose using a para-nitroanilide synthetic peptide substrate. *Anal. Biochem.* **177**: 78-84.

Kwinn,L.A., Khosravi,A., Aziz,R.K., Timmer,A.M., Doran,K.S., Kotb,M., and Nizet,V. (2007a) Genetic characterization and virulence role of the RALP3/LSA locus upstream of the streptolysin s operon in invasive M1T1 Group A Streptococcus. *J. Bacteriol.* **189**: 1322-1329.

Kwinn,L.A., Khosravi,A., Aziz,R.K., Timmer,A.M., Doran,K.S., Kotb,M., and Nizet,V. (2007b) Genetic characterization and virulence role of the RALP3/LSA locus upstream of the streptolysin s operon in invasive M1T1 Group A Streptococcus. *J. Bacteriol.* **189**: 1322-1329.

Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lahteenmaki,K., Kuusela,P., and Korhonen,T.K. (2001) Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 531-552.

Lancefield,R.C. (1928) THE ANTIGENIC COMPLEX OF STREPTOCOCCUS HAEMOLYTICUS : I. DEMONSTRATION OF A TYPE-SPECIFIC SUBSTANCE IN EXTRACTS OF STREPTOCOCCUS HAEMOLYTICUS. *J. Exp. Med.* **47**: 91-103.

Lancefield,R.C. (1933) A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *J. Exp. Med.* **57**: 571-595.

Lancefield,R.C. (1962) Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J. Immunol.* **89**: 307-313.

LaPenta,D., Rubens,C., Chi,E., and Cleary,P.P. (1994) Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**: 12115-12119.

Lishko,V.K., Novokhatny,V.V., Yakubenko,V.P., Skomorovska-Prokvolit,H.V., and Ugarova,T.P. (2004) Characterization of plasminogen as an adhesive ligand for integrins alphaMbeta2 (Mac-1) and alpha5beta1 (VLA-5). *Blood* **104**: 719-726.

Lottenberg,R., Broder,C.C., Boyle,M.D., Kain,S.J., Schroeder,B.L., and Curtiss,R., III (1992a) Cloning, sequence analysis, and expression in Escherichia coli of a streptococcal plasmin receptor. *J. Bacteriol.* **174**: 5204-5210.

Lottenberg,R., Broder,C.C., Boyle,M.D., Kain,S.J., Schroeder,B.L., and Curtiss,R., III (1992b) Cloning, sequence analysis, and expression in Escherichia coli of a streptococcal plasmin receptor. *J. Bacteriol.* **174**: 5204-5210.

Loughman,J.A. and Caparon,M.G. (2006) A novel adaptation of aldolase regulates virulence in Streptococcus pyogenes. *EMBO J.* **25**: 5414-5422.

Loughman, J.A. and Caparon, M.G. (2007) Comparative functional analysis of the lac operons in *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **64**: 269-280.

Markowitz, M., Gerber, M.A., and Kaplan, E.L. (1993) Treatment of streptococcal pharyngotonsillitis: reports of penicillin's demise are premature. *J. Pediatr.* **123**: 679-685.

McArthur, J.D., McKay, F.C., Ramachandran, V., Shyam, P., Cork, A.J., Sanderson-Smith, M.L. et al. (2008) Allelic variants of streptokinase from *Streptococcus pyogenes* display functional differences in plasminogen activation. *FASEB J.* **22**: 3146-3153.

Mclver, K.S., Heath, A.S., Green, B.D., and Scott, J.R. (1995) Specific binding of the activator Mga to promoter sequences of the emm and scpA genes in the group A streptococcus. *J. Bacteriol.* **177**: 6619-6624.

Molinari, G. and Chhatwal, G.S. (1999) Streptococcal invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 56-61.

Molinari, G., Talay, S.R., Valentin-Weigand, P., Rohde, M., and Chhatwal, G.S. (1997) The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect. Immun.* **65**: 1357-1363.

Mora, M., Bensi, G., Capo, S., Falugi, F., Zingaretti, C., Manetti, A.G. et al. (2005) Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**: 15641-15646.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.

Musser, J.M. and DeLeo, F.R. (2005) Toward a genome-wide systems biology analysis of host-pathogen interactions in group A *Streptococcus*. *Am. J. Pathol.* **167**: 1461-1472.

Nakata, M., Koller, T., Moritz, K., Ribardo, D., Jonas, L., Mclver, K.S. et al. (2009b) Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region-encoded proteins in *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect. Immun.* **77**: 32-44.

Nakata, M., Koller, T., Moritz, K., Ribardo, D., Jonas, L., Mclver, K.S. et al. (2009a) Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region-encoded proteins in *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect. Immun.* **77**: 32-44.

Okada, N., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Caparon, M. (1995) Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**: 2489-2493.

Okada, N., Pentland, A.P., Falk, P., and Caparon, M.G. (1994) M protein and protein F act as important determinants of cell-specific tropism of *Streptococcus pyogenes* in skin tissue. *J. Clin. Invest* **94**: 965-977.

Oliver, S.L., Wood, E., Asobayire, E., Wathes, D.C., Brickell, J.S., Elschner, M. et al. (2007) Serotype 1 and 2 bovine noroviruses are endemic in cattle in the United kingdom and Germany. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3050-3052.

Ozeri, V., Rosenshine, I., Mosher, D.F., Fassler, R., and Hanski, E. (1998) Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol. Microbiol.* **30**: 625-637.

- Pancholi,V. and Fischetti,V.A. (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**: 415-426.
- Pancholi,V. and Fischetti,V.A. (1998) alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J. Biol. Chem.* **273**: 14503-14515.
- Pancholi,V., Fontan,P., and Jin,H. (2003) Plasminogen-mediated group A streptococcal adherence to and pericellular invasion of human pharyngeal cells. *Microb. Pathog.* **35**: 293-303.
- Parkinson,J.S. and Kofoed,E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
- Patterson,M.J. (1996) Streptococcus.
- Patti,J.M., Allen,B.L., McGavin,M.J., and Hook,M. (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 585-617.
- Persad,S. and Dedhar,S. (2003b) The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **22**: 375-384.
- Persad,S. and Dedhar,S. (2003a) The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **22**: 375-384.
- Phelps,H.A. and Neely,M.N. (2007) SalY of the Streptococcus pyogenes lantibiotic locus is required for full virulence and intracellular survival in macrophages. *Infect. Immun.* **75**: 4541-4551.
- Pichichero,M.E., Hoeger,W., Marsocci,S.M., Murphy,A.M., Francis,A.B., and Dragalin,V. (1999) Variables influencing penicillin treatment outcome in streptococcal tonsillopharyngitis. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **153**: 565-570.
- Podbielski,A., Baird,R., and Kaufhold,A. (1992) The group A streptococcal M-type 3 protein gene exhibits a C terminus typical for class I M proteins. *Med. Microbiol. Immunol.* **181**: 209-213.
- Podbielski,A. and Kreikemeyer,B. (2001) Persistence of group A streptococci in eukaryotic cells--a safe place? *Lancet* **358**: 3-4.
- Podbielski,A. and Kreikemeyer,B. (2004) Cell density--dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int. J. Infect. Dis.* **8**: 81-95.
- Podbielski,A., Melzer,B., and Luttkien,R. (1991) Application of the polymerase chain reaction to study the M protein(-like) gene family in beta-hemolytic streptococci. *Med. Microbiol. Immunol.* **180**: 213-227.
- Podbielski,A., Woischnik,M., Leonard,B.A., and Schmidt,K.H. (1999) Characterization of nra, a global negative regulator gene in group A streptococci. *Mol. Microbiol.* **31**: 1051-1064.
- Podbielski,A., Woischnik,M., Pohl,B., and Schmidt,K.H. (1996) What is the size of the group A streptococcal vir regulon? The Mga regulator affects expression of secreted and surface virulence factors. *Med. Microbiol. Immunol.* **185**: 171-181.
- Ponting,C.P., Marshall,J.M., and Cederholm-Williams,S.A. (1992b) Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **3**: 605-614.

Ponting,C.P., Marshall,J.M., and Cederholm-Williams,S.A. (1992a) Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **3**: 605-614.

Poon-King,R., Bannan,J., Viteri,A., Cu,G., and Zabriskie,J.B. (1993) Identification of an extracellular plasmin binding protein from nephritogenic streptococci. *J. Exp. Med.* **178**: 759-763.

Ribardo,D.A. and McIver,K.S. (2006) Defining the Mga regulon: Comparative transcriptome analysis reveals both direct and indirect regulation by Mga in the group A streptococcus. *Mol. Microbiol.* **62**: 491-508.

Rosch,J. and Caparon,M. (2004) A microdomain for protein secretion in Gram-positive bacteria. *Science* **304**: 1513-1515.

Rosey,E.L., Oskouian,B., and Stewart,G.C. (1991) Lactose metabolism by *Staphylococcus aureus*: characterization of lacABCD, the structural genes of the tagatose 6-phosphate pathway. *J. Bacteriol.* **173**: 5992-5998.

Rosey,E.L. and Stewart,G.C. (1992) Nucleotide and deduced amino acid sequences of the lacR, lacABCD, and lacFE genes encoding the repressor, tagatose 6-phosphate gene cluster, and sugar-specific phosphotransferase system components of the lactose operon of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **174**: 6159-6170.

Sambrook,J. and Gething,M.J. (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**: 224-225.

Sanderson-Smith,M.L., Dinkla,K., Cole,J.N., Cork,A.J., Maamary,P.G., McArthur,J.D. et al. (2008) M protein-mediated plasminogen binding is essential for the virulence of an invasive *Streptococcus pyogenes* isolate. *FASEB J.* **22**: 2715-2722.

Sanderson-Smith,M.L., Dowton,M., Ranson,M., and Walker,M.J. (2007) The plasminogen-binding group A streptococcal M protein-related protein Prp binds plasminogen via arginine and histidine residues. *J. Bacteriol.* **189**: 1435-1440.

Saravani,G.A. and Martin,D.R. (1990) Opacity factor from group A streptococci is an apoproteinase. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 35-39.

Schrager,H.M., Alberti,S., Cywes,C., Dougherty,G.J., and Wessels,M.R. (1998) Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A *Streptococcus* to CD44 on human keratinocytes. *J. Clin. Invest* **101**: 1708-1716.

Schrager,H.M., Rheinwald,J.G., and Wessels,M.R. (1996) Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *J. Clin. Invest* **98**: 1954-1958.

Serrano,R.L., Rodriguez,P., Pizzo,S.V., and Gonzalez-Gronow,M. (1996) ATP-regulated activity of the plasmin-streptokinase complex: a novel mechanism involving phosphorylation of streptokinase. *Biochem. J.* **313** (Pt 1): 171-177.

Shelburne,S.A., III, Fang,H., Okorafor,N., Sumby,P., Sitkiewicz,I., Keith,D. et al. (2007a) MalE of group A *Streptococcus* participates in the rapid transport of maltotriose and longer maltodextrins. *J. Bacteriol.* **189**: 2610-2617.

Shelburne,S.A., III, Keith,D., Horstmann,N., Sumby,P., Davenport,M.T., Graviss,E.A. et al. (2008) A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**: 1698-1703.

- Shelburne,S.A., III, Okorafor,N., Sitkiewicz,I., Sumby,P., Keith,D., Patel,P. et al. (2007b) Regulation of polysaccharide utilization contributes to the persistence of group a streptococcus in the oropharynx. *Infect. Immun.* **75**: 2981-2990.
- Sitkiewicz,I. and Musser,J.M. (2006) Expression microarray and mouse virulence analysis of four conserved two-component gene regulatory systems in group a streptococcus. *Infect. Immun.* **74**: 1339-1351.
- Skerra,A. and Schmidt,T.G. (2000) Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**: 271-304.
- Smith,H.E., Reek,F.H., Vecht,U., Gielkens,A.L., and Smits,M.A. (1993) Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infect. Immun.* **61**: 3318-3326.
- Smith,W.D., Pointon,J.A., Abbot,E., Kang,H.J., Baker,E.N., Hirst,B.H. et al. (2010) Roles of minor pilin subunits Spy0125 and Spy0130 in the serotype M1 *Streptococcus pyogenes* strain SF370. *J. Bacteriol.* **192**: 4651-4659.
- Takada,Y., Ye,X., and Simon,S. (2007) The integrins. *Genome Biol.* **8**: 215.
- Talay,S.R., Valentin-Weigand,P., Jerlstrom,P.G., Timmis,K.N., and Chhatwal,G.S. (1992) Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect. Immun.* **60**: 3837-3844.
- Top,F.H., Jr. and Wannamaker,L.W. (1968a) The serum opacity reaction of *Streptococcus pyogenes*. The demonstration of multiple, strain-specific lipoproteinase antigens. *J. Exp. Med.* **127**: 1013-1034.
- Top,F.H., Jr. and Wannamaker,L.W. (1968b) The serum opacity reaction of *Streptococcus pyogenes*: frequency of production of streptococcal lipoproteinase by strains of different serological types and the relationship of M protein production. *J. Hyg. (Lond)* **66**: 49-58.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**: 4350-4354.
- Trieu-Cuot,P., Carlier,C., Poyart-Salmeron,C., and Courvalin,P. (1991) Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a lacZ alpha gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *Gene* **102**: 99-104.
- van,d.R., I and Kessler,R.E. (1980) Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect. Immun.* **27**: 444-448.
- Vecht,U., Wisselink,H.J., Jellema,M.L., and Smith,H.E. (1991) Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* **59**: 3156-3162.
- Walker,M.J., McArthur,J.D., McKay,F., and Ranson,M. (2005) Is plasminogen deployed as a *Streptococcus pyogenes* virulence factor? *Trends Microbiol.* **13**: 308-313.
- Wang,B., Li,S., Dedhar,S., and Cleary,P.P. (2007) Paxillin phosphorylation: bifurcation point downstream of integrin-linked kinase (ILK) in streptococcal invasion. *Cell Microbiol.* **9**: 1519-1528.
- Wang,B., Yurecko,R.S., Dedhar,S., and Cleary,P.P. (2006) Integrin-linked kinase is an essential link between integrins and uptake of bacterial pathogens by epithelial cells. *Cell Microbiol.* **8**: 257-266.

Weber,K. and Osborn,M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.

Wei,Y., Czekay,R.P., Robillard,L., Kugler,M.C., Zhang,F., Kim,K.K. et al. (2005) Regulation of alpha5beta1 integrin conformation and function by urokinase receptor binding. *J. Cell Biol.* **168**: 501-511.

Wei,Y., Eble,J.A., Wang,Z., Kreidberg,J.A., and Chapman,H.A. (2001) Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1. *Mol. Biol. Cell* **12**: 2975-2986.

Wessels,M.R. and Bronze,M.S. (1994) Critical role of the group A streptococcal capsule in pharyngeal colonization and infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**: 12238-12242.

Wessels,M.R., Moses,A.E., Goldberg,J.B., and DiCesare,T.J. (1991) Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**: 8317-8321.

Williams,A.W., Gurley,C.R., Sobel,E., and Castelda,M. (1932) Milk-borne Septic Sore Throat and Scarlet Fever and Their Relation to Beta Hemolytic Streptococci. *J. Bacteriol.* **23**: 241-258.

Yilmaz,O., Watanabe,K., and Lamont,R.J. (2002) Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol.* **4**: 305-314.

Zeng,L., Das,S., and Burne,R.A. (2010) Utilization of lactose and galactose by *Streptococcus mutans*: transport, toxicity, and carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* **192**: 2434-2444.

6.3 Abbildungen

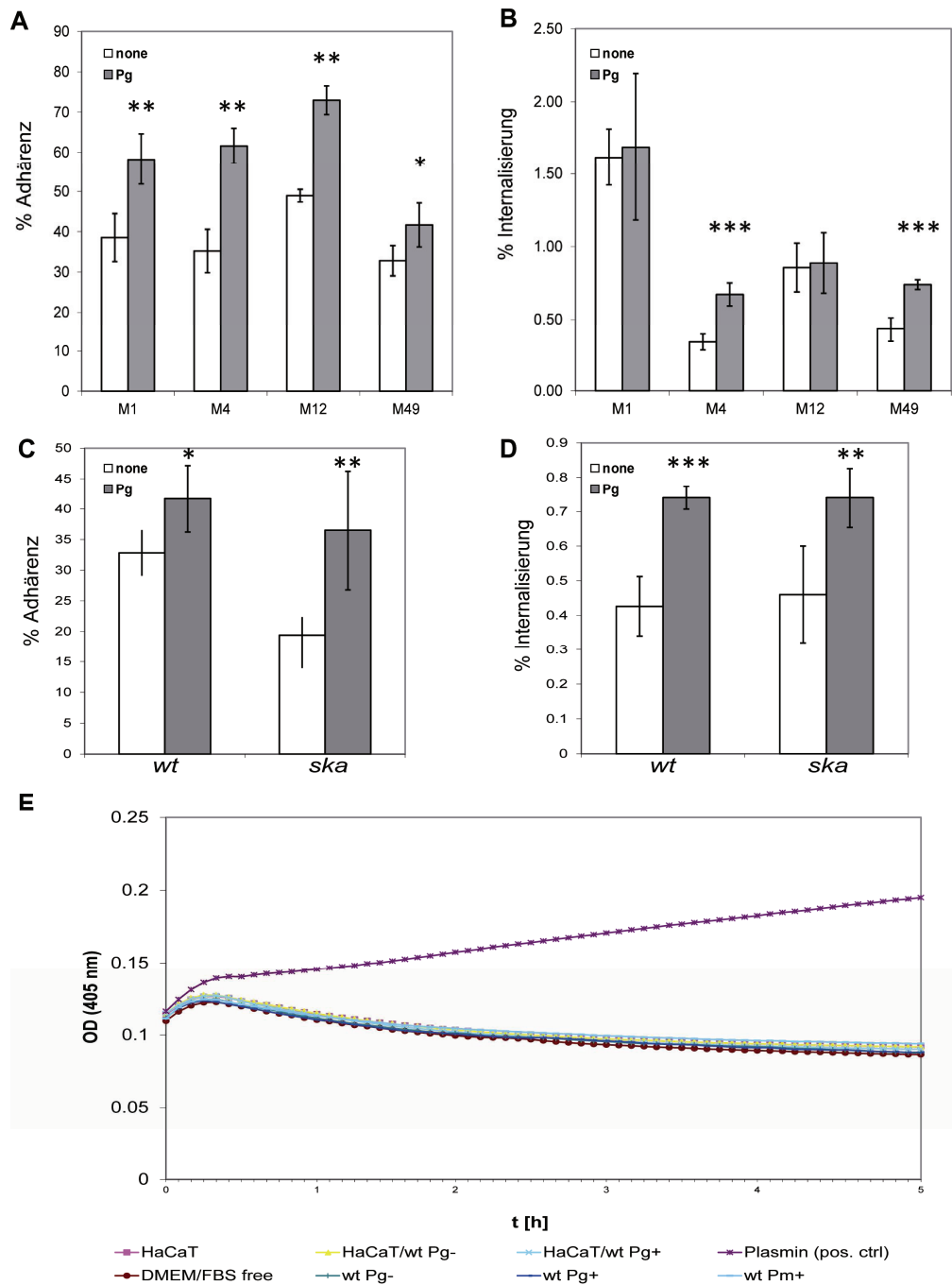


Abbildung A1: *S. pyogenes* Serotyp-abhängige Adhärenz an (A) und Internalisierung in (B) humane Keratinocyten. (C) Adhärenz an und Internalisierung in (D) HaCaT-Zellen von Wildtyp (wt) M49 und *ska*⁻-Insertionsmutante. (E) Plasminaktivitätsmessung von HaCaT-Zellen, GAS M49 und GAS M49 mit HaCaT-Zellen. none, unbeschichtet; Pg, Plasminogen-beschichtet.

6.4 Tabellen

Tabelle A1: Globale Transkriptomanalyse der *S. pyogenes* M49 Δ ralp3-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Gene sind geordnet nach dem offenen Leserahmen (ORF). Zusätzlich ist die Standardabweichung (SD) aufgelistet.

ORF#	Log ₂ Expression der Ratio			
	Array 1	Array 2	Ratio	SD
Spy49_0002	-1.183828719	-1.133233457	-1.158531088	0.03577625
Spy49_0003	-0.579358977	-0.45806361	-0.518711294	0.08576878
Spy49_0005	-0.657317501	-0.824011793	-0.740664647	0.11787066
Spy49_0006	-0.819569685	-0.85322265	-0.836396167	0.02379624
Spy49_0008	-0.507131317	-0.500483198	-0.503807258	0.00470093
Spy49_0009	-0.849764167	-0.753308694	-0.801536431	0.06820432
Spy49_0010	-0.752169	-0.824285014	-0.788227007	0.05099372
Spy49_0011	-0.884944361	-0.891151388	-0.888047874	0.00438903
Spy49_0012	-0.758834271	-0.720139662	-0.739486966	0.02736122
Spy49_0013	-0.399806013	-0.416441244	-0.408123629	0.01176288
Spy49_0014	-0.372478103	-0.425967757	-0.39922293	0.0378229
Spy49_0015	0.255212588	0.32388583	0.289549209	0.04855931
Spy49_0017		0.264968364	0.264968364	
Spy49_0018	0.229873849	0.219138652	0.224506251	0.00759093
Spy49_0019	-0.409017973	-0.36827856	-0.388648267	0.02880712
Spy49_0020		0.217611041	0.217611041	
Spy49_0021		0.239752409	0.239752409	
Spy49_0022	-0.349252372	-0.244437988	-0.29684518	0.07411496
Spy49_0025	0.277448024	0.35955749	0.318502757	0.05806016
Spy49_0030	-0.772632038	-0.714772596	-0.743702317	0.0409128
Spy49_0031	-0.584664024	-0.554957545	-0.569810785	0.02100565
Spy49_0032	-0.333974601		-0.333974601	
Spy49_0033	0.50235311	0.460621273	0.481487192	0.02950887
Spy49_0038	0.124602221		0.124602221	
Spy49_0039	0.591713019	0.566227827	0.578970423	0.01802075
Spy49_0040	0.18321996	0.183391994	0.183305977	0.00012165
Spy49_0045	-0.293879664	-0.315946648	-0.304913156	0.01560371
Spy49_0046	-0.470792246	-0.422148697	-0.446470471	0.03439618
Spy49_0048	-0.542383268	-0.525803091	-0.534093179	0.01172396
Spy49_0049	-0.450068691	-0.449506756	-0.449787724	0.00039735
Spy49_0050	-0.515015003	-0.504202395	-0.509608699	0.00764567
Spy49_0052	-0.451390701	-0.445071834	-0.448231267	0.00446811
Spy49_0053	-0.567143053	-0.572688792	-0.569915922	0.00392143
Spy49_0054	-0.644400387	-0.640874835	-0.642637611	0.00249294
Spy49_0055	-0.578076943	-0.567167494	-0.572622219	0.00771415
Spy49_0056	-0.66680612	-0.654873966	-0.660840043	0.00843731
Spy49_0057	-0.701566445	-0.691293666	-0.696430055	0.00726395
Spy49_0058	-0.703508283	-0.750776446	-0.727142365	0.03342364
Spy49_0059	-0.735628491	-0.779596093	-0.757612292	0.03108979
Spy49_0060	-0.640519316	-0.673401292	-0.656960304	0.02325107
Spy49_0061	-0.657743345	-0.674972013	-0.666357679	0.01218251
Spy49_0062	-0.772633558	-0.711726512	-0.742180035	0.04306779
Spy49_0064	-0.67518724	-0.65284183	-0.664014535	0.01580059
Spy49_0065	-0.695044528	-0.71809346	-0.706568994	0.01629806
Spy49_0066	-0.773946969	-0.826327849	-0.800137409	0.03703888
Spy49_0067	-0.685199846	-0.739864862	-0.712532354	0.038654

Spy49_0068	-0.863939164	-0.883482327	-0.873710745	0.0138191
Spy49_0069	-0.636301931	-0.642176238	-0.639239085	0.00415376
Spy49_0070	-0.309267707	-0.305874941	-0.307571324	0.00239905
Spy49_0071	-0.412290627	-0.421592797	-0.416941712	0.00657763
Spy49_0072		-0.128305016	-0.128305016	
Spy49_0073	0.156961804	0.165907052	0.161434428	0.00632525
Spy49_0074	0.223420202	0.156610448	0.190015325	0.04724163
Spy49_0078	0.354108062	0.385447714	0.369777888	0.02216048
Spy49_0079	0.25742731	0.232835466	0.245131388	0.01738906
Spy49_0080	0.215978969	0.206848987	0.211413978	0.00645587
Spy49_0082		-0.195747969	-0.195747969	
Spy49_0084	0.263247188	0.233768444	0.248507816	0.02084462
Spy49_0086	-0.141521207	-0.163430203	-0.152475705	0.015492
Spy49_0087	-0.395652045	-0.396318111	-0.395985078	0.00047098
Spy49_0092	-0.445105533		-0.445105533	
Spy49_0097	-0.294834686	-0.283183706	-0.289009196	0.00823849
Spy49_0100	1.020892154	1.090236665	1.055564409	0.04903397
Spy49_0101	1.069768148	1.137350065	1.103559107	0.04778763
Spy49_0108		0.147749665	0.147749665	
Spy49_0109c	0.163579882	0.153139014	0.158359448	0.00738281
Spy49_0110c	-0.182140027	-0.190755931	-0.186447979	0.00609236
Spy49_0111	-0.469027395	-0.461721325	-0.46537436	0.00516617
Spy49_0112	-0.200844554	-0.41090179	-0.305873172	0.1485329
Spy49_0116	0.275971781	0.203075961	0.239523871	0.05154513
Spy49_0117	0.544730876	0.405820642	0.475275759	0.09822437
Spy49_0118	1.028353085	0.998328897	1.013340991	0.02123031
Spy49_0119	-1.181179726	-1.096194305	-1.138687015	0.06009377
Spy49_0120c	-0.446515098	-0.482818138	-0.464666618	0.02567013
Spy49_0122c	-0.459117549	-0.285131707	-0.372124628	0.12302657
Spy49_0125	-0.52588656	-0.597353439	-0.561619999	0.05053471
Spy49_0126c	0.31388897	0.294404192	0.304146581	0.01377782
Spy49_0127	-0.817120171	-0.834894585	-0.826007378	0.01256841
Spy49_0128	-0.893520957	-0.918914363	-0.90621766	0.01795585
Spy49_0129	-1.173517196	-1.079796086	-1.126656641	0.06627083
Spy49_0130	-0.959792852	-0.994409922	-0.977101387	0.02447796
Spy49_0131	-0.68580141	-0.679860909	-0.682831159	0.00420057
Spy49_0132	-0.650680108	-0.644080356	-0.647380232	0.00466673
Spy49_0133	-0.583555187	-0.569882822	-0.576719004	0.00966782
Spy49_0134	-0.492757568	-0.483336084	-0.488046826	0.006662
Spy49_0138c	0.669322533	0.70486214	0.687092337	0.0251303
Spy49_0139c	0.883897287	0.927973876	0.905935581	0.03116686
Spy49_0142	-0.303775722	-0.222394565	-0.263085144	0.05754517
Spy49_0143	0.266323005	0.235497803	0.250910404	0.02179671
Spy49_0144	-1.130097621	-1.097724994	-1.113911308	0.0228909
Spy49_0145	-1.073953599	-1.081388716	-1.077671158	0.00525742
Spy49_0146	-0.606524002	-0.61343349	-0.609978746	0.00488575
Spy49_0149c	-0.411193877	-0.466768159	-0.438981018	0.03929695
Spy49_0153	-0.351727935	-0.289349001	-0.320538468	0.04410857
Spy49_0158	0.477002392	0.525694865	0.501348629	0.03443078
Spy49_0159	-0.29807373	-0.312070549	-0.305072139	0.00989725
Spy49_0160	-0.446820703	-0.444675123	-0.445747913	0.00151715
Spy49_0161	-1.485153101	-1.439672494	-1.462412798	0.03215965
Spy49_0162	-1.752824791	-1.685604938	-1.719214865	0.04753161
Spy49_0163	0.559639036	0.583093578	0.571366307	0.01658487
Spy49_0164	0.362954138	0.381625591	0.372289864	0.01320271
Spy49_0165	0.313302397	0.32280764	0.318055019	0.00672122

Spy49_0166		0.197163117	0.197163117	
Spy49_0167	-0.24959024	-0.264177289	-0.256883765	0.0103146
Spy49_0173c	-0.218882943		-0.218882943	
Spy49_0178c		0.220268778	0.220268778	
Spy49_0180c	0.598812714	0.592575677	0.595694196	0.00441025
Spy49_0181	0.313618176	0.390829773	0.352223974	0.05459684
Spy49_0182		0.368351877	0.368351877	
Spy49_0183		0.318563619	0.318563619	
Spy49_0184	0.479422528		0.479422528	
Spy49_0185	0.492296019		0.492296019	
Spy49_0187	0.345724394	0.404587743	0.375156068	0.04162267
Spy49_0190	0.322264261	0.35667672	0.339470491	0.02433328
Spy49_0191c	0.354502036	0.324270629	0.339386333	0.02137683
Spy49_0192c	0.836626742	0.879985418	0.85830608	0.03065921
Spy49_0193	0.375201171	0.428745077	0.401973124	0.03786126
Spy49_0194	0.342059844	0.439239715	0.390649779	0.06871655
Spy49_0195	0.554052339	0.548274442	0.551163391	0.00408559
Spy49_0198	0.439963919	0.535428227	0.487696073	0.06750346
Spy49_0199	-0.412415292		-0.412415292	
Spy49_0200	0.292903402	0.333148908	0.313026155	0.02845787
Spy49_0201	0.240132096	0.235895273	0.238013684	0.00299589
Spy49_0204	-0.167986513	-0.236089801	-0.202038157	0.0481563
Spy49_0207	-0.439877774	-0.41621379	-0.428045782	0.01673296
Spy49_0208		-0.136275136	-0.136275136	
Spy49_0209	-0.360189401	-0.305579642	-0.332884521	0.03861493
Spy49_0210	-1.204944057	-1.200112584	-1.20252832	0.00341637
Spy49_0211	0.52274167	0.504767934	0.513754802	0.01270935
Spy49_0212	0.404654225	0.39444335	0.399548787	0.00722018
Spy49_0214	0.230096867	0.199269417	0.214683142	0.0217983
Spy49_0215	0.422343998	0.366534731	0.394439364	0.03946311
Spy49_0216	0.521324773	0.433758973	0.477541873	0.06191837
Spy49_0217		0.250103218	0.250103218	
Spy49_0219	0.263261612	0.2466541	0.254957856	0.01174328
Spy49_0220	0.269372649	0.28564108	0.277506864	0.01150352
Spy49_0221	0.374944871	0.432787984	0.403866427	0.04090126
Spy49_0223	0.41664737	0.426564375	0.421605872	0.00701238
Spy49_0224	0.429129155	0.396291694	0.412710424	0.02321959
Spy49_0225	0.348906804	0.315294591	0.332100697	0.02376742
Spy49_0227	-0.373959293	-0.349665223	-0.361812258	0.0171785
Spy49_0228	-0.524346569	-0.514560823	-0.519453696	0.00691957
Spy49_0229	-0.558467393	-0.569577904	-0.564022649	0.00785632
Spy49_0234	0.219737028		0.219737028	
Spy49_0235c	-0.588002133		-0.588002133	
Spy49_0236c	-0.302004885	-0.347651938	-0.324828412	0.03227734
Spy49_0238	0.676614047	0.680039121	0.678326584	0.00242189
Spy49_0239	0.584276096	0.583687846	0.583981971	0.00041596
Spy49_0240	0.211385314	0.219454041	0.215419678	0.00570545
Spy49_0241	-0.447923287	-0.406543527	-0.427233407	0.02925991
Spy49_0242	0.691110585	0.739399415	0.715255	0.03414536
Spy49_0243	0.300603938	0.331745682	0.31617481	0.02202054
Spy49_0245	-0.168406487	-0.180657871	-0.174532179	0.00866304
Spy49_0246	-0.582296728	-0.527658207	-0.554977468	0.03863527
Spy49_0249	-1.082849235	-1.135868024	-1.10935863	0.03748994
Spy49_0250	-0.523115078	-0.555965913	-0.539540495	0.02322905
Spy49_0251	-0.387355261	-0.359413217	-0.373384239	0.01975801
Spy49_0254c	-1.653006758	-1.712819595	-1.682913176	0.04229406

Spy49_0256	-0.815701413	-0.792608928	-0.804155171	0.01632885
Spy49_0257	-0.317252774	-0.267027784	-0.292140279	0.03551443
Spy49_0258	-0.569141459	-0.612322296	-0.590732209	0.03053393
Spy49_0259	-0.817332397	-0.803937957	-0.810635177	0.0094713
Spy49_0260	-0.880134669	-0.868484964	-0.874309817	0.00823759
Spy49_0261	-0.576679725	-0.732145181	-0.654412453	0.10993068
Spy49_0262	-0.711967593	-0.769005681	-0.740486637	0.04033202
Spy49_0263	-0.45976125	-0.438694621	-0.449227935	0.01489636
Spy49_0264	-0.49524796	-0.643979448	-0.569613704	0.10516904
Spy49_0266	0.506634336	0.558105671	0.532370003	0.03639573
Spy49_0270	0.173614221	0.168713527	0.171163874	0.00346531
Spy49_0272	-0.425260343		-0.425260343	
Spy49_0273c	0.291835502	0.367571351	0.329703427	0.05355333
Spy49_0274c	0.561409922	0.598244753	0.579827337	0.02604616
Spy49_0275	-0.801631004	-0.911585058	-0.856608031	0.07774926
Spy49_0276	0.437692012	0.452024991	0.444858501	0.01013495
Spy49_0277	0.182163933	0.161253853	0.171708893	0.01478566
Spy49_0279	-0.261843812		-0.261843812	
Spy49_0280	-0.417490051	-0.513063584	-0.465276817	0.06758069
Spy49_0281	-0.859161254	-0.813497025	-0.836329139	0.03228949
Spy49_0282	-0.932270075	-0.919755763	-0.926012919	0.00884895
Spy49_0283	-0.278876384	-0.291863078	-0.285369731	0.00918298
Spy49_0284		0.128262382	0.128262382	
Spy49_0285	-0.273606238	-0.284040382	-0.27882331	0.00737805
Spy49_0286		-0.280041961	-0.280041961	
Spy49_0287	-0.177100597	-0.178063425	-0.177582011	0.00068082
Spy49_0288	-0.412373232	-0.399048234	-0.405710733	0.0094222
Spy49_0289	-0.185209668	-0.206409298	-0.195809483	0.0149904
Spy49_0290	-0.62471491	-0.625648113	-0.625181511	0.00065987
Spy49_0291	1.089197309	1.105494377	1.097345843	0.01152377
Spy49_0292c	1.013836329	1.061175842	1.037506086	0.03347409
Spy49_0293	0.284112539	0.234096475	0.259104507	0.0353667
Spy49_0294	1.228765137	1.272109927	1.250437532	0.0306494
Spy49_0295	0.710247438	0.720417693	0.715332566	0.00719146
Spy49_0297	0.238108267	0.244322776	0.241215521	0.00439432
Spy49_300		-0.186474822	-0.186474822	
Spy49_0304	0.313164223	0.277365059	0.295264641	0.02531383
Spy49_0306	-0.282343484	-0.270100226	-0.276221855	0.00865729
Spy49_0307	0.489393932	0.522071321	0.505732626	0.0231064
Spy49_0308	-0.815040139	-0.670053345	-0.742546742	0.10252115
Spy49_0311	-0.345193668		-0.000813046	
Spy49_0313	0.340445709	0.343567576	-0.011584115	0.49784535
Spy49_0314	0.152881326		0.272457345	
Spy49_0317c	-0.528982416	-0.36361394	0.037479435	0.80109803
Spy49_0319c	0.409548653	0.392033363	0.400791008	0.00619259
Spy49_0323	0.602483961	0.603941285	0.603212623	0.00051524
Spy49_0326	0.24102155	0.255890797	0.248456173	0.01051415
Spy49_0327	0.213520488	0.203097642	0.208309065	0.00737007
Spy49_0328	0.298664884	0.253454674	0.276059779	0.03196845
Spy49_0329	0.300570671	0.333667712	0.317119192	0.02340314
Spy49_0330	0.410639274	0.429678196	0.420158735	0.01346255
Spy49_0331	0.23142012	0.213395314	0.222407717	0.01274546
Spy49_0332c	0.938068421	1.03430898	0.9861887	0.06805235
Spy49_0333	0.360573628	0.341939535	0.351256581	0.01317629
Spy49_0334c	0.927187786	0.91111247	0.919150128	0.01136696
Spy49_0335	0.193073152	0.245471932	0.219272542	0.03705153

Spy49_0338	-0.200180273		-0.200180273	
Spy49_0339	-0.67612268	-0.940128479	-0.80812558	0.18668029
Spy49_0340	-1.194010438	-1.178850062	-1.18643025	0.01072
Spy49_0341	-0.537724562	-0.586933702	-0.562329132	0.03479612
Spy49_0342c	1.060432259	1.080040003	1.070236131	0.01386477
Spy49_0343	-2.092768302	-2.04423008	-2.068499191	0.03432171
Spy49_0344	-1.998261407	-1.972061626	-1.985161516	0.01852604
Spy49_0345c	-0.41966703	-2.403128437	-1.411397733	1.40251901
Spy49_0347	-2.36478896	-0.824786505	-1.594787733	1.08894618
Spy49_0348	-0.713836911	-0.483721894	-0.598779402	0.16271589
Spy49_0357c	-0.596339055	-0.534778089	-0.565558572	0.04353018
Spy49_0358c	-0.414014915	-0.534778089	-0.474396502	0.08539246
Spy49_0360c	0.412703279	0.827904283	0.620303781	0.29359145
Spy49_0361c	-0.748625588		-0.748625588	
Spy49_0363c	-0.787295043	-0.863669941	-0.825482492	0.05400521
Spy49_0365c	-0.446482279	-1.167811669	-0.807146974	0.5100569
Spy49_0367c	0.244386595	0.292884442	0.268635518	0.03429316
Spy49_0368c	0.459106005	0.482702819	0.470904412	0.01668547
Spy49_0370	0.250968848	0.208840472	0.22990466	0.02978926
Spy49_0371	-0.155469084	-0.092656688	-0.124062886	0.04441507
Spy49_0372	-0.546116781	-0.516271077	-0.531193929	0.0211041
Spy49_0372	-0.546116781	-0.516271077	-0.531193929	0.0211041
Spy49_0374	-0.805283952	-0.760348281	-0.782816117	0.03177432
Spy49_0375	0.195581309	0.172206246	0.183893777	0.01652867
Spy49_0376	0.349629785	0.332463679	0.341046732	0.01213827
Spy49_0377	0.29941137	0.398453369	0.34893237	0.07003327
Spy49_0378	0.662861196	0.689172287	0.676016741	0.01860475
Spy49_0379	0.687709039	0.636077574	0.661893306	0.03650896
Spy49_0380c		0.227167333	0.227167333	
Spy49_0382	-0.468901379	-0.513266264	-0.491083821	0.03137071
Spy49_0383	-0.984578633	-1.016464513	-1.000521573	0.02254672
Spy49_0384c	0.199433642	0.222009191	0.210721417	0.01596332
Spy49_0385	0.238019827	0.28421668	0.261118253	0.03266611
Spy49_0387	0.254560787	0.240499227	0.247530007	0.00994302
Spy49_0392	-0.334972425	-0.287387421	-0.311179923	0.03364768
Spy49_0396	0.634553867	0.629161123	0.631857495	0.00381325
Spy49_0400	0.271036084	0.299118732	0.285077408	0.01985743
Spy49_0401	0.199016321	0.24299144	0.221003881	0.0310951
Spy49_0407c	-1.005817105	-0.962803004	-0.984310055	0.03041556
Spy49_0409	0.161164703	0.225463986	0.193314344	0.04546646
Spy49_0414c	0.435592326	0.401854444	0.418723385	0.02385629
Spy49_0415	0.390906684	0.465756777	0.428331731	0.05292701
Spy49_0416	0.831368561	0.847745776	0.839557168	0.01158044
Spy49_0417	0.76123131	0.94839609	0.8548137	0.13234549
Spy49_0418	1.275885632	1.2910605	1.283473066	0.01073025
Spy49_0419	0.841830492	0.813066977	0.827448735	0.02033888
Spy49_0421	-1.279260002	-1.245798043	-1.262529022	0.02366118
Spy49_0422	-0.452129185	-0.440239336	-0.44618426	0.00840739
Spy49_0423	-0.419869568	-0.405608933	-0.41273925	0.01008379
Spy49_0425c	0.315129472	0.3899379	0.352533686	0.05289755
Spy49_0427c	-0.230765469	-0.173189746	-0.201977607	0.04071218
Spy49_0427c		-0.211991523	-0.211991523	
Spy49_0429c	0.722491993	0.742238231	0.732365112	0.0139627
Spy49_0430c	0.690486647	0.691546314	0.691016481	0.0007493
Spy49_0431c	0.523695129	0.511930174	0.517812652	0.00831908
Spy49_0433	-0.182385676	-0.134293237	-0.158339457	0.03400649

Spy49_0436	0.624030408		0.624030408	
Spy49_0437	0.477553204	0.505360896	0.49145705	0.01966301
Spy49_0444	0.258891776	0.249939323	0.25441555	0.00633034
Spy49_0445		0.122104407	0.122104407	
Spy49_0447	0.272564561	0.369187159	0.32087586	0.06832249
Spy49_0448	0.17209805	0.238809845	0.205453948	0.04717236
Spy49_0450		0.494471218	0.494471218	
Spy49_0451		0.381929201	0.381929201	
Spy49_0453	0.268408402	0.215270174	0.241839288	0.0375744
Spy49_0459	0.263741514		0.263741514	
Spy49_0466		0.22390798	0.22390798	
Spy49_0467	0.391683597	0.33053098	0.361107288	0.04324143
Spy49_0468	-0.451813838		-0.451813838	
Spy49_0469		-0.728444912	-0.728444912	
Spy49_0473	-0.322501596	-0.255135345	-0.288818471	0.04763513
Spy49_0474	-0.54012371	-0.519446191	-0.529784951	0.01462121
Spy49_0475	-0.36242141	-0.408535793	-0.385478602	0.03260779
Spy49_0476	-0.495644002	-0.502200229	-0.498922116	0.00463595
Spy49_0479	-0.595898796		-0.595898796	
Spy49_0480	0.554515082	0.562413205	0.558464144	0.00558482
Spy49_0481	0.711323711	0.67946992	0.695396816	0.02252403
Spy49_0482	0.94847997	0.966918642	0.957699306	0.01303811
Spy49_0485	-0.279130952	-0.261487368	-0.27030916	0.0124759
Spy49_0487	-0.394757442	-0.25313961	-0.323948526	0.10013893
Spy49_0488c	-0.274071258	-0.249402378	-0.261736818	0.01744353
Spy49_0489c	-0.273630465	-0.320503278	-0.297066872	0.03314408
Spy49_0490	0.79745257	0.790070117	0.793761343	0.00522018
Spy49_0491	0.563853776	0.601469565	0.582661671	0.02659838
Spy49_0494	0.244879876	0.276140012	0.260509944	0.02210425
Spy49_0495	0.215114826	0.203596097	0.209355461	0.00814497
Spy49_0497	0.180798773	0.261806511	0.221302642	0.05728112
Spy49_0498	-0.315000982	-0.392099766	-0.353550374	0.05451707
Spy49_0501	-0.196912042	-0.21837015	-0.207641096	0.01517317
Spy49_0502c	-0.621819235	-0.659275382	-0.640547309	0.0264855
Spy49_0503c	-0.260607556	-0.19542055	-0.228014053	0.04609417
Spy49_0504	0.332222247	0.339757667	0.335989957	0.00532835
Spy49_0505c	-0.354191019	-0.378266122	-0.36622857	0.01702367
Spy49_0506c	-0.320356317		-0.320356317	
Spy49_0507c	-0.386643661	-0.479674168	-0.433158915	0.0657825
Spy49_0508c		0.227369328	0.227369328	
Spy49_0509	0.249450317	0.409860778	0.329655547	0.11342732
Spy49_0510	0.483536793	0.48994065	0.486738721	0.00452821
Spy49_0513	0.198694294	0.203356539	0.201025417	0.00329671
Spy49_0514	0.254110121		0.254110121	
Spy49_0515	0.436397044	0.341938055	0.38916755	0.06679259
Spy49_0520c	0.258299172	0.263903368	0.26110127	0.00396276
Spy49_0521		0.226573758	0.226573758	
Spy49_0525c	0.752801675	0.852709539	0.802755607	0.07064553
Spy49_0526c	0.774409332	0.943568887	0.85898911	0.11961387
Spy49_0527c	0.619708046	0.721638205	0.670673126	0.07207551
Spy49_0530	0.149492988	0.203531826	0.176512407	0.03821123
Spy49_0531	-0.362261262	-0.289832577	-0.326046919	0.05121481
Spy49_0532		0.490190667	0.490190667	
Spy49_0533	0.36654055	0.382340777	0.374440664	0.01117245
Spy49_0534	0.41158233	0.456412337	0.433997334	0.0316996
Spy49_0535	0.36134346	0.353717819	0.357530639	0.00539214

Spy49_0536	0.248146786	0.255834131	0.251990459	0.00543577
Spy49_0537	0.25512785	0.270528344	0.262828097	0.01088979
Spy49_0539c	0.990605377	0.996317875	0.993461626	0.00403935
Spy49_0540	0.769509069	0.771973616	0.770741342	0.0017427
Spy49_0543	-0.647070946	-0.639212711	-0.643141829	0.00555661
Spy49_0544	-0.574653091	-0.59413135	-0.584392221	0.01377321
Spy49_0545	0.762142465	0.726967112	0.744554788	0.02487273
Spy49_0546	0.891013309	0.930357892	0.9106856	0.02782082
Spy49_0547	0.802167486	0.797915096	0.800041291	0.00300689
Spy49_0548	-0.213455911	-0.168026705	-0.190741308	0.0321233
Spy49_0550	0.589990849	0.58030972	0.585150285	0.00684559
Spy49_0551	0.990540684	1.010036964	1.000288824	0.01378595
Spy49_0552c	-1.019919636	-1.004933651	-1.012426644	0.01059669
Spy49_0554c	0.420174939	0.398404771	0.409289855	0.01539383
Spy49_0557		0.230216788	0.230216788	
Spy49_0558	0.208193725	0.252713929	0.230453827	0.03148054
Spy49_0560	-0.437063429	-0.415370363	-0.426216896	0.01533931
Spy49_0561	-0.639327475	-0.586248138	-0.612787807	0.03753276
Spy49_0562c	-1.059282103	-0.96889615	-1.014089126	0.06391252
Spy49_0563	0.790561039	0.722678129	0.756619584	0.04800047
Spy49_0564c	2.451705006	2.466575623	2.459140315	0.01051511
Spy49_0565c	2.50851293	2.426188256	2.467350593	0.05821234
Spy49_0566c	-3.474458173	-4.142383538	-3.808420856	0.47229455
Spy49_0568	-0.5195884	-0.620284985	-0.569936693	0.07120324
Spy49_0569	-0.618490236	-0.634045916	-0.626268076	0.01099953
Spy49_0570	-0.886303766	-0.906040887	-0.896172326	0.01395625
Spy49_0572	-0.961343652	-1.026482242	-0.993912947	0.04605994
Spy49_0573	-0.732971075	-0.831240613	-0.782105844	0.06948706
Spy49_0574	-0.823116718	-0.8324094	-0.827763059	0.00657092
Spy49_0575	-0.782251034	-0.785224104	-0.783737569	0.00210228
Spy49_0576		-0.309095609	-0.309095609	
Spy49_0577	-0.619046527	-0.561124426	-0.590085476	0.04095711
Spy49_0578	-0.587062401	-0.604998337	-0.596030369	0.01268262
Spy49_0579	-0.614607427	-0.610076933	-0.61234218	0.00320354
Spy49_0580	0.383930738	0.33558181	0.359756274	0.03418785
Spy49_0584	-0.289955776	-0.277568477	-0.283762127	0.00875914
Spy49_0585	-0.326241301	-0.346245391	-0.336243346	0.01414503
Spy49_0591	0.271949111	0.278904566	0.275426838	0.00491825
Spy49_0592		0.186050438	0.186050438	
Spy49_0596	-0.347086421	-0.419691189	-0.383388805	0.05133932
Spy49_0598	0.433445781	0.416168706	0.424807243	0.01221674
Spy49_0599	0.384963224	0.40632191	0.395642567	0.01510287
Spy49_0600	0.318085182	0.306566031	0.312325606	0.00814527
Spy49_0602c	1.479129134	1.526885907	1.503007521	0.03376914
Spy49_0604	0.277216255	0.304500762	0.290858509	0.01929306
Spy49_0605	0.411450218	0.387769372	0.399609795	0.01674489
Spy49_0606	-0.867747286	-0.815795669	-0.841771477	0.03673534
Spy49_0608	1.181554217	1.202381987	1.191968102	0.01472746
Spy49_0609	0.616688641	0.626262218	0.62147543	0.00676954
Spy49_0610	0.663420954	0.666844287	0.66513262	0.00242066
Spy49_0611	0.563436292	0.563491059	0.563463676	3.8726E-05
Spy49_0612	0.110065185	0.105659173	0.107862179	0.00311552
Spy49_0613	-0.23402116	-0.29055805	-0.262289605	0.03997762
Spy49_0614	-0.501011866	-0.465922448	-0.483467157	0.02481197
Spy49_0615	-0.62319966	-0.670128237	-0.646663949	0.03318351
Spy49_0617	-0.963866336	-0.922675191	-0.943270763	0.02912654

Spy49_0618	-0.616910483	-0.628022032	-0.622466258	0.00785705
Spy49_0619	-0.500711206	-0.48967456	-0.495192883	0.00780409
Spy49_0620		-0.416902095	-0.416902095	
Spy49_0621	-0.454965053	-0.411608252	-0.433286652	0.03065789
Spy49_0622	-0.611836009	-0.592488994	-0.602162501	0.01368041
Spy49_0623	-0.636124639	-0.627708337	-0.631916488	0.00595122
Spy49_0624	0.588577881	0.578187012	0.583382447	0.00734745
Spy49_0625	0.637550154	0.611072073	0.624311113	0.01872283
Spy49_0626c	0.82096333	0.815701495	0.818332413	0.00372068
Spy49_0627	0.659068458	0.610903839	0.634986148	0.03405753
Spy49_0628	0.34817122	0.31452867	0.331349945	0.02378887
Spy49_0630	-0.302789528		-0.302789528	
Spy49_0631	-0.351211968	-0.333260334	-0.342236151	0.01269372
Spy49_0633	-0.345753229	-0.378423949	-0.362088589	0.02310169
Spy49_0634	-0.275062489	-0.279401403	-0.277231946	0.00306808
Spy49_0638c	0.791587722	0.782028046	0.786807884	0.00675971
Spy49_0639c	0.655580901	0.665404596	0.660492749	0.0069464
Spy49_0640	0.259514267	0.222902221	0.241208244	0.02588863
Spy49_0641	-0.363139335	-0.311042216	-0.337090775	0.03683823
Spy49_0642	0.785448859	0.831118573	0.808283716	0.03229336
Spy49_0643	0.444134412	0.42075348	0.432443946	0.01653282
Spy49_0644	0.332698196		0.332698196	
Spy49_0645	-0.309364576	-0.282085449	-0.295725012	0.01928926
Spy49_0650	0.312506027	0.256541153	0.28452359	0.03957314
Spy49_0651	0.197033243		0.197033243	
Spy49_0653	-0.247403188	-0.250770252	-0.24908672	0.00238087
Spy49_0654	-0.464209563	-0.440624725	-0.452417144	0.016677
Spy49_0655	-0.152512361	-0.142612362	-0.147562362	0.00700036
Spy49_0657	-0.276619461	-0.262932812	-0.269776136	0.00967792
Spy49_0659	-0.544757381	-0.582396262	-0.563576821	0.02661471
Spy49_0660	-0.748778849	-0.743593553	-0.746186201	0.00366656
Spy49_0661	-0.689140165	-0.69134218	-0.690241172	0.00155706
Spy49_0662	-0.765105948	-0.716913568	-0.741009758	0.03407716
Spy49_0663c	-0.552286562	-0.63331393	-0.592800246	0.057295
Spy49_0664	-0.658550879	-0.69762465	-0.678087764	0.02762933
Spy49_0665	-0.682215051	-0.717417123	-0.699816087	0.02489162
Spy49_0667	-0.826384801	-0.770416027	-0.798400414	0.0395759
Spy49_0668	-0.911695263	-0.876604719	-0.894149991	0.02481276
Spy49_0672	-1.638098033	-1.643704849	-1.640901441	0.00396462
Spy49_0673	-1.65117599	-1.691880638	-1.671528314	0.02878253
Spy49_0674	-1.816063158	-1.870737671	-1.843400414	0.03866072
Spy49_0676	0.608195139	0.614493318	0.611344228	0.00445349
Spy49_0682	-0.584529916	-0.534440061	-0.559484988	0.03541888
Spy49_0683	-0.389907071	-0.36124811	-0.375577591	0.02026495
Spy49_0686c	0.444699503	0.372358075	0.408528789	0.05115311
Spy49_0688	0.390303169	0.380136403	0.385219786	0.00718899
Spy49_0689	0.250027156	0.253087194	0.251557175	0.00216377
Spy49_0690	0.404607688	0.431010988	0.417809338	0.01866995
Spy49_0691	0.456206452	0.484885303	0.470545878	0.02027901
Spy49_0692	0.376378743	0.358046799	0.367212771	0.01296264
Spy49_0693	0.407318594	0.397167489	0.402243041	0.00717792
Spy49_0694c	0.52300916	0.459712261	0.49136071	0.04475767
Spy49_0695c		0.288182061	0.288182061	
Spy49_0696	0.554338943	0.510944404	0.532641673	0.03068457
Spy49_0697	0.730955956	0.741660699	0.736308327	0.0075694
Spy49_0698	0.755713727	0.764263087	0.759988407	0.00604531

Spy49_0700	0.695751206	0.702907146	0.699329176	0.00506001
Spy49_0701	0.327652187	0.304451697	0.316051942	0.01640522
Spy49_0703c	0.66737198	0.654925827	0.661148904	0.00880076
Spy49_0704	0.473679491	0.606152712	0.539916102	0.09367271
Spy49_0705		0.105335464	0.105335464	
Spy49_0706	0.195597308	0.18492465	0.190260979	0.00754671
Spy49_0710c	0.733753988	0.821498631	0.777626309	0.06204483
Spy49_0712	0.540421526	0.557045161	0.548733343	0.01175469
Spy49_0713	0.203602361	0.344274259	0.27393831	0.09947005
Spy49_0714	0.288062137	0.301643246	0.294852691	0.00960329
Spy49_0717	0.341331236	0.492620688	0.416975962	0.1069778
Spy49_0720	0.331789128	0.311837419	0.321813273	0.01410799
Spy49_0724	-0.282421775		-0.282421775	
Spy49_0726	-0.643455596	-0.583440617	-0.613448106	0.042437
Spy49_0727		-0.801709466	-0.801709466	
Spy49_0728	-0.59765569	-0.725942575	-0.661799132	0.09071253
Spy49_0729c	0.319638511	0.369295053	0.344466782	0.03511248
Spy49_0730	0.177615384	0.26192587	0.219770627	0.05961652
Spy49_0731	0.277972373	0.345559542	0.311765957	0.04779135
Spy49_0732	0.232337803	0.323867735	0.278102769	0.06472144
Spy49_0733	0.220932913	0.242080267	0.23150659	0.01495344
Spy49_0734	0.396264947	0.318428377	0.357346662	0.05503877
Spy49_0736	-0.100700785	-0.070376	-0.085538393	0.02144286
Spy49_0737	-0.539128232	-0.489304316	-0.514216274	0.03523083
Spy49_0738	-0.81668858	-0.817928381	-0.81730848	0.00087667
Spy49_0739	-0.330660733	-0.356847516	-0.343754125	0.01851685
Spy49_0740	-0.272082568	-0.295932802	-0.284007685	0.01686466
Spy49_0741	-0.292148002		-0.292148002	
Spy49_0744	-0.3330763	-0.347141769	-0.340109035	0.00994579
Spy49_0745	-0.595529058	-0.609820099	-0.602674578	0.01010529
Spy49_0793	-0.176787424	-0.168523689	-0.172655557	0.00584334
Spy49_0795	-0.246188307	-0.245216224	-0.245702265	0.00068737
Spy49_0796c	0.204309522	0.243648732	0.223979127	0.02781702
Spy49_0797	0.14577474		0.14577474	
Spy49_0801	0.212531614	0.223818665	0.218175139	0.00798115
Spy49_0803	-0.362659973	-0.384419996	-0.373539984	0.01538666
Spy49_0804	-0.655407337	-0.617211016	-0.636309176	0.02700888
Spy49_0805	-0.499921996	-0.470368079	-0.485145037	0.02089777
Spy49_0807	0.415673443	0.377948973	0.396811208	0.02667523
Spy49_0813c	0.517483225	0.51383008	0.515656652	0.00258316
Spy49_0814c	0.757780249	0.775015554	0.766397902	0.0121872
Spy49_0819		0.230287383	0.230287383	
Spy49_0820	0.240259368	0.235820664	0.238040016	0.00313864
Spy49_0821	0.269747373	0.259249464	0.264498419	0.00742314
Spy49_0823	0.235578801	0.279098613	0.257338707	0.03077315
Spy49_0825	0.491904699	0.475587767	0.483746233	0.01153781
Spy49_0826	0.356784315	0.360860579	0.358822447	0.00288235
Spy49_0827	0.390834835	0.459376533	0.425105684	0.0484663
Spy49_0829	0.338036525	0.378087076	0.358061801	0.02832002
Spy49_0830	-2.601755839	-2.635869988	-2.618812914	0.02412235
Spy49_0831	0.204935233	0.200287387	0.20261131	0.00328652
Spy49_0832	0.949154198	1.016558362	0.98285628	0.04766194
Spy49_0833	0.380057031	0.388871728	0.38446438	0.00623293
Spy49_0834	0.729501348	0.738704984	0.734103166	0.00650795
Spy49_0835	0.95598102	0.961650886	0.958815953	0.0040092
Spy49_0836	1.015700514	0.977057063	0.996378789	0.02732505

Spy49_0837	0.194125263	0.232969399	0.213547331	0.02746695
Spy49_0839	0.369838758	0.284540192	0.327189475	0.06031519
Spy49_0840	0.427763627	0.44476448	0.436264054	0.01202142
Spy49_0841	0.4202075	0.366242191	0.393224845	0.03815924
Spy49_0842	0.375297605	0.391615745	0.383456675	0.01153867
Spy49_0843	0.217532255	0.173280844	0.195406549	0.03129047
Spy49_0844	0.463113501		0.463113501	
Spy49_0845c	0.254616657	0.274365323	0.26449099	0.01396442
Spy49_0848	-0.181114385	-0.167939899	-0.174527142	0.00931577
Spy49_0850c	-0.453511574	-0.480138118	-0.466824846	0.01882781
Spy49_0852	0.475643378	0.461384492	0.468513935	0.01008256
Spy49_0853	0.554135369	0.556789793	0.555462581	0.00187696
Spy49_0854	0.500199258	0.499188085	0.499693671	0.00071501
Spy49_0855	0.568279458	0.550030748	0.559155103	0.01290379
Spy49_0856	0.338596016		0.338596016	
Spy49_0857	-0.23476531	-0.217511782	-0.226138546	0.01220009
Spy49_0858	-0.363682337	-0.354755676	-0.359219007	0.0063121
Spy49_0859	-0.496315388	-0.462851314	-0.479583351	0.02366267
Spy49_0860	-0.25077389	-0.300144698	-0.275459294	0.03491043
Spy49_0861c	1.039463613	1.039039543	1.039251578	0.00029986
Spy49_0862c	1.052747662	1.017797154	1.035272408	0.02471374
Spy49_0863	2.032791337	2.063770058	2.048280698	0.02190526
Spy49_0864	2.326402593	2.246236808	2.2863197	0.05668577
Spy49_0865c	0.715978393	0.683064	0.699521196	0.02327399
Spy49_0867		-0.978590449	-0.978590449	
Spy49_0871c	-0.952181609	-0.969059918	-0.960620764	0.01193477
Spy49_0872c	-0.500673071	-0.490108702	-0.495390887	0.00747014
Spy49_0873		-0.411290105	-0.411290105	
Spy49_0874c	-0.562174321	-0.564223232	-0.563198777	0.0014488
Spy49_0875c	-0.506888889	-0.529534228	-0.518211558	0.01601267
Spy49_0876c	-0.680095218	-0.636508899	-0.658302058	0.03082018
Spy49_0877	-0.790929141	-0.749764909	-0.770347025	0.02910751
Spy49_0878	-0.789010541	-0.809794228	-0.799402385	0.01469629
Spy49_0879	-0.858516583	-0.950018402	-0.904267493	0.06470156
Spy49_0880	0.244594229	0.2287708	0.236682515	0.01118885
Spy49_0881	0.592583331	0.641393058	0.616988195	0.03451369
Spy49_0882c	0.561050208	0.671574365	0.616312286	0.07815238
Spy49_0883	0.36350876	0.354089777	0.358799269	0.00666023
Spy49_0884	0.240583485	0.26551635	0.253049918	0.0176302
Spy49_0892		-0.415526346	-0.415526346	
Spy49_0894	-0.522965285	-0.43317088	-0.478068082	0.06349423
Spy49_0895	-0.737986863	-0.647126498	-0.69255668	0.06424798
Spy49_0896	-0.427343139	-0.559879221	-0.49361118	0.09371716
Spy49_0897		-0.237579014	-0.237579014	
Spy49_0899	-0.23401797	-0.242504829	-0.2382614	0.00600112
Spy49_0901		-0.195187318	-0.195187318	
Spy49_0902	-0.334170307	-0.369316274	-0.35174329	0.02485195
Spy49_0903	-0.66546354	-0.692450945	-0.678957242	0.01908298
Spy49_0904c	0.280979705	0.294235018	0.287607362	0.00937292
Spy49_0905	-0.310870911	-0.336749203	-0.323810057	0.01829872
Spy49_0907	-0.386523924	-0.366945687	-0.376734805	0.0138439
Spy49_0908	-0.308086244	-0.3817175	-0.344901872	0.05206516
Spy49_0911c	-0.422035101	-0.412866486	-0.417450794	0.00648319
Spy49_0913	0.274962693	0.203047135	0.239004914	0.05085198
Spy49_0915	0.425651687	0.42594628	0.425798984	0.00020831
Spy49_0920	0.79375508	0.805659873	0.799707477	0.00841796

Spy49_0921	0.688744164	0.675197811	0.681970988	0.00957872
Spy49_0922	0.652305949	0.663881698	0.658093823	0.00818529
Spy49_0926	0.271843603		0.271843603	
Spy49_0927c	0.183829227	0.139033019	0.161431123	0.0316757
Spy49_0928c		0.174261822	0.174261822	
Spy49_0943c	0.594061773	0.631609079	0.612835426	0.02654995
Spy49_0944	0.494739598		0.494739598	
Spy49_0945c	-0.791881402	-0.836335972	-0.814108687	0.03143413
Spy49_0946c	-0.302078021	-0.335738432	-0.318908227	0.0238015
Spy49_0949	0.397963265	0.431534069	0.414748667	0.02373814
Spy49_0952c	-0.38244404	-0.413409618	-0.397926829	0.02189597
Spy49_0954c	0.483071251	0.56031153	0.521691391	0.05461712
Spy49_0957c	0.378681296	0.38897772	0.383829508	0.00728067
Spy49_0959c	0.297511797	0.31589716	0.306704479	0.01300041
Spy49_0963c		0.147698095	0.147698095	
Spy49_0967		0.252599012	0.252599012	
Spy49_0970	-0.201128955	-0.223657069	-0.212393012	0.01592978
Spy49_0971c	-0.518005701	-0.52691134	-0.522458521	0.00629724
Spy49_0972c	-0.588337246	-0.623137279	-0.605737263	0.02460734
Spy49_0973c	-0.763685129	-0.730321278	-0.747003204	0.02359181
Spy49_0975c		-0.228676615	-0.228676615	
Spy49_0976c		-0.218281484	-0.218281484	
Spy49_0978	-1.025066722	-1.060618951	-1.042842837	0.02513922
Spy49_0979c	-0.365599602	-0.280332792	-0.322966197	0.06029274
Spy49_0981c		0.178400034	0.178400034	
Spy49_0982c	-0.536668054	-0.454580423	-0.495624238	0.05804472
Spy49_0983c	-0.395636472	-0.332111773	-0.363874123	0.04491875
Spy49_0984c	-0.352936902	-0.343929202	-0.348433052	0.00636941
Spy49_0985c	-0.195211512	-0.262543566	-0.228877539	0.04761095
Spy49_0986	-0.296442019	-0.283284239	-0.289863129	0.00930396
Spy49_0987c	-0.36981107	-0.401908276	-0.385859673	0.02269615
Spy49_0988c	-0.414864546	-0.456481625	-0.435673085	0.02942772
Spy49_0989c	0.18206106	0.171369794	0.176715427	0.00755987
Spy49_0990c		0.172989875	0.172989875	
Spy49_0992c	0.3260505	0.330376661	0.328213581	0.00305906
Spy49_0993c	0.640802387	0.595246989	0.618024688	0.03221253
Spy49_0994c	0.496459077	0.523354695	0.509906886	0.01901807
Spy49_0995c	0.616120522	0.546139407	0.581129965	0.04948412
Spy49_0996c	0.651913387	0.745716473	0.69881493	0.0663288
Spy49_0997c	0.295586917	0.260552038	0.278069478	0.0247734
Spy49_1000c	-1.155735894	-1.128516256	-1.142126075	0.01924719
Spy49_1001c	-0.94407858	-0.915638683	-0.929858632	0.02011004
Spy49_1002c	-0.375199725	-0.35787502	-0.366537372	0.01225042
Spy49_1003c	-0.485420129	-0.459541259	-0.472480694	0.01829912
Spy49_1004c	-0.513077737	-0.578169135	-0.545623436	0.04602657
Spy49_1005c	-0.781494009	-0.853335808	-0.817414909	0.05079982
Spy49_1006c	-1.143035803	-1.195907432	-1.169471617	0.03738589
Spy49_1007c	0.716537762	0.695815157	0.70617646	0.01465309
Spy49_1009	0.904313681	0.950200903	0.927257292	0.03244717
Spy49_1012c	0.369088974	0.161425817	0.265257396	0.14684003
Spy49_1014c	-0.519009614		-0.519009614	
Spy49_1015c	-0.735750391	-0.758126785	-0.746938588	0.0158225
Spy49_1016c	0.343903172	0.380462492	0.362182832	0.02585134
Spy49_1018c	0.350827954	0.333423047	0.342125501	0.01230713
Spy49_1024	-1.67847035	-1.705307009	-1.691888679	0.01897638
Spy49_1025c	0.311262336	0.313586949	0.312424643	0.00164375

Spy49_1027c	0.335046082	0.379130739	0.357088411	0.03117256
Spy49_1028	0.234405179	0.2433069	0.238856039	0.00629447
Spy49_1030	0.282150822	0.283630123	0.282890472	0.00104602
Spy49_1033c	-0.563137137	-0.530496594	-0.546816865	0.02308035
Spy49_1034c	-0.446005259	-0.44004974	-0.443027499	0.00421119
Spy49_1035c	-0.374873891	-0.405357434	-0.390115662	0.02155512
Spy49_1036c	-0.457781176	-0.554656724	-0.50621895	0.06850136
Spy49_1037c	-0.280971394	-0.326244177	-0.303607785	0.03201269
Spy49_1038c	-0.325936675	-0.387621497	-0.356779086	0.04361776
Spy49_1039c	-0.169752894	-0.15859413	-0.164173512	0.00789044
Spy49_1040	-1.062149349	-1.115330943	-1.088740146	0.03760507
Spy49_1041	-0.86640905	-0.925682067	-0.896045558	0.04191235
Spy49_1042c	0.755352338	0.703631067	0.729491703	0.03657246
Spy49_1043c	0.882105699	0.895967504	0.889036602	0.00980178
Spy49_1044c	0.593840022	0.629990404	0.611915213	0.02556218
Spy49_1045c	0.77289642	0.733631051	0.753263736	0.02776481
Spy49_1046c	0.654079406	0.621704476	0.637891941	0.02289253
Spy49_1047c	0.362608358	0.372315278	0.367461818	0.00686383
Spy49_1048c	0.445386221	0.395615635	0.420500928	0.03519312
Spy49_1049c	0.441650899	0.528407988	0.485029443	0.06134653
Spy49_1050	0.391371694	0.351799611	0.371585653	0.02798169
Spy49_1051c	-1.307046087	-1.306975185	-1.307010636	5.0136E-05
Spy49_1053c	0.181675061	0.19924504	0.190460051	0.01242385
Spy49_1054	-0.999589351	-0.605123253	-0.802356302	0.27892965
Spy49_1055	0.321311759	0.460672013	0.390991886	0.09854258
Spy49_1056	-0.899598553	-0.617772783	-0.758685668	0.19928091
Spy49_1057	0.359474279	0.436093915	0.397784097	0.05417826
Spy49_1059	0.566471009	0.660493854	0.613482431	0.06648419
Spy49_1060	-0.238241711	-0.205163515	-0.221702613	0.02338982
Spy49_1061c	-0.411570074		-0.411570074	
Spy49_1064c	0.450075767	0.501383602	0.475729685	0.03628012
Spy49_1065	0.699271861	0.620320085	0.659795973	0.05582734
Spy49_1066c		0.746459308	0.746459308	
Spy49_1074c	-0.183262018	-0.187390748	-0.185326383	0.00291945
Spy49_1075c	-0.211601117	-0.20607366	-0.208837388	0.0039085
Spy49_1076c	-0.458645424	-0.448131309	-0.453388367	0.0074346
Spy49_1077c	-0.368491906	-0.353078436	-0.360785171	0.01089897
Spy49_1078c	-0.314150779	-0.337409793	-0.325780286	0.01644661
Spy49_1079c	-0.461005763	-0.349375243	-0.405190503	0.0789347
Spy49_1082c	0.287298405	0.273971512	0.280634958	0.00942354
Spy49_1083c		0.149663108	0.149663108	
Spy49_1085	0.927048863	0.9378047	0.932426782	0.00760553
Spy49_1087c	0.237240269	0.245820795	0.241530532	0.00606735
Spy49_1088c	0.587463024	0.60553814	0.596500582	0.01278104
Spy49_1090c	-0.690430058	-0.679230014	-0.684830036	0.00791963
Spy49_1091	0.808356794	0.826729317	0.817543055	0.01299134
Spy49_1092c	-0.515022474	-0.525346682	-0.520184578	0.00730032
Spy49_1093c		-0.260373186	-0.260373186	
Spy49_1095c	0.564905979	0.50449765	0.534701814	0.04271514
Spy49_1096	-0.539165066	-0.643298209	-0.591231637	0.07363325
Spy49_1097	-0.55096812	-0.555822632	-0.553395376	0.00343266
Spy49_1098	-0.558868787	-0.780981269	-0.669925028	0.15705724
Spy49_1099	-1.072453515	-1.120973745	-1.09671363	0.03430898
Spy49_1100	0.664794374	0.683046028	0.673920201	0.01290587
Spy49_1101		-0.289671246	-0.289671246	
Spy49_1103	-0.419349144	-0.316015257	-0.367682201	0.07306809

Spy49_1105c	0.441268334	0.482851896	0.462060115	0.02940402
Spy49_1106c	0.568144597	0.562475142	0.565309869	0.00400891
Spy49_1107c	0.406662812	0.482139717	0.444401265	0.05337023
Spy49_1109c	0.340778273	0.373274245	0.357026259	0.02297812
Spy49_1109c	0.340778273	0.373274245	0.357026259	0.02297812
Spy49_1110c	0.342805944	0.271614995	0.307210469	0.0503396
Spy49_1111c	1.215843822	1.198462722	1.207153272	0.01229029
Spy49_1112c	-0.16812686	-0.207392256	-0.187759558	0.02776483
Spy49_1113c	0.809001375	0.986258957	0.897630166	0.12534004
Spy49_1114c	2.133376766	2.257997531	2.195687148	0.08812019
Spy49_1115c	2.799093442	2.965197799	2.88214562	0.11745352
Spy49_1116	0.319409491	0.650635354	0.485022423	0.23421205
Spy49_1117	0.275283756	0.289732617	0.282508187	0.01021689
Spy49_1122c	-0.595130001	-0.66522657	-0.630178285	0.04956576
Spy49_1123c	0.327682421	0.29836482	0.313023621	0.02073067
Spy49_1128	0.434732405		0.434732405	
Spy49_1130c		-0.227455958	-0.227455958	
Spy49_1132c	-0.48220778	-0.408707949	-0.445457865	0.05197223
Spy49_1133c	-0.407472731	-0.456690939	-0.432081835	0.03480253
Spy49_1135c	-0.316027888	-0.273029917	-0.294528903	0.03040416
Spy49_1138c	0.205519384	0.283440596	0.24447999	0.05509862
Spy49_1139c		0.223531536	0.223531536	
Spy49_1140c	0.397187865	0.389958159	0.393573012	0.00511217
Spy49_1141c	0.346624953	0.483985483	0.415305218	0.09712856
Spy49_1143c	1.030779096	0.621730228	0.826254662	0.28924123
Spy49_1144	-0.272834932		-0.272834932	
Spy49_1145c	0.491330297	0.759474973	0.625402635	0.18960692
Spy49_1146c	1.158530278	0.897219718	1.027874998	0.18477447
Spy49_1147c	-0.454600215	1.034964463	0.290182124	1.05328128
Spy49_1148c		1.172709208	1.172709208	
Spy49_1149c		1.310453953	1.310453953	
Spy49_1150c	-0.086354969	-0.105008866	-0.095681918	0.0131903
Spy49_1152c	-0.192572815		-0.192572815	
Spy49_1153c	-0.452233055	-0.462228678	-0.457230867	0.00706797
Spy49_1154c	-0.219654269	-0.226831929	-0.223243099	0.00507537
Spy49_1157c		0.174450395	0.174450395	
Spy49_1160c	-0.269649483	-0.352953959	-0.311301721	0.05890516
Spy49_1164	0.350427883	0.303655334	0.327041608	0.03307319
Spy49_1165	0.797212907	0.809679003	0.803445955	0.00881486
Spy49_1167c		-0.304827816		
Spy49_1168c	-0.904645247	-0.899187775	-0.901916511	0.00385902
Spy49_1169c	-1.092172385	-1.050154364	-1.071163375	0.02971123
Spy49_1170c	-0.969216518	-0.909267429	-0.939241974	0.04239041
Spy49_1171c	-1.019834686	-1.01070602	-1.015270353	0.00645494
Spy49_1172c	-0.892698613	-0.936099144	-0.914398878	0.03068881
Spy49_1173c	-0.859460581	-0.912113995	-0.885787288	0.03723159
Spy49_1174c	-0.61357729	-0.563088997	-0.588333144	0.03570061
Spy49_1179c	-0.407497965	-0.362891877	-0.385194921	0.03154127
Spy49_1180c	-0.385039234	-0.40656769	-0.395803462	0.01522292
Spy49_1182c	-0.429136977	-0.371359241	-0.400248109	0.04085503
Spy49_1185c	-0.761323489	-0.758246884	-0.759785187	0.00217549
Spy49_1187c	-0.447901076	-0.456668758	-0.452284917	0.00619969
Spy49_1188c	-0.653694755	-0.630390746	-0.642042751	0.01647842
Spy49_1189c		-0.207862623		
Spy49_1191c	-0.431754414	-0.447932699	-0.439843557	0.01143977
Spy49_1194c	-0.316049212	-0.353418263	-0.334733737	0.02642391

Spy49_1196c	-0.61604475	-0.642828533	-0.629436641	0.01893899
Spy49_1199	1.034528805	0.91812393	0.976326368	0.08231068
Spy49_1200c	0.451702026	0.47176255	0.461732288	0.01418493
Spy49_1201c	0.364335419	0.288961621	0.32664852	0.05329732
Spy49_1202c	0.709959062	0.775398601	0.742678831	0.04627274
Spy49_1203c	0.507131419		0.507131419	
Spy49_1204c	-0.342640417	-0.374250162	-0.35844529	0.02235146
Spy49_1205c	-0.522332407		-0.522332407	
Spy49_1207c	-0.373468813	-0.313257695	-0.343363254	0.04257569
Spy49_1208c	-0.221121796	-0.205176656	-0.213149226	0.01127492
Spy49_1210c	-0.351640088	-0.259160864	-0.305400476	0.06539269
Spy49_1211c	-0.448282521	-0.433353904	-0.440818212	0.01055613
Spy49_1213c	0.410309189	0.401658425	0.405983807	0.00611701
Spy49_1215c	0.402294871	0.369460453	0.385877662	0.02321744
Spy49_1216c	0.86796334	0.992987138	0.930475239	0.08840518
Spy49_1217c	0.59995482	0.612308427	0.606131623	0.00873532
Spy49_1220	0.803459006	0.811571975	0.807515491	0.00573674
Spy49_1221	0.810185432	0.846996451	0.828590941	0.02602932
Spy49_1222c	0.523650572	0.555462701	0.539556637	0.02249457
Spy49_1223c	0.683663671	0.657009837	0.670336754	0.01884711
Spy49_1224c	0.889812118	0.898844894	0.894328506	0.00638714
Spy49_1225c	0.541945254	0.529192869	0.535569062	0.0090173
Spy49_1226c	0.519867644	0.560878679	0.540373162	0.02899918
Spy49_1230c	0.111841532	0.137797672	0.124819602	0.01835376
Spy49_1233c	-0.28423836		-0.28423836	
Spy49_1234	0.23956766		0.23956766	
Spy49_1235c	0.866068815	0.882550792	0.874309804	0.01165452
Spy49_1236c	1.015526329	1.056741592	1.03613396	0.02914359
Spy49_1237c	0.481884995	0.455662051	0.468773523	0.01854242
Spy49_1238	1.298345698	1.405766955	1.352056326	0.0759583
Spy49_1239	1.528491656	1.626339698	1.577415677	0.06918901
Spy49_1240c	0.300542089	0.311047333	0.305794711	0.00742833
Spy49_1241c	1.083790671	1.06877453	1.076282601	0.01061802
Spy49_1242		0.395911381	0.395911381	
Spy49_1243	-0.433440439	-0.360896192	-0.397168316	0.05129653
Spy49_1244	-0.42692682	-0.455992229	-0.441459524	0.02055235
Spy49_1245	-0.667187291		-0.667187291	
Spy49_1250	0.399442268	0.459749082	0.429595675	0.04264336
Spy49_1251	0.390449999	0.3841493	0.38729965	0.00445527
Spy49_1252c	-0.212273984	-0.208893897	-0.210583941	0.00239008
Spy49_1255c	-0.163077584	-0.171574373	-0.167325979	0.00600814
Spy49_1256c	-0.340681553	-0.358079329	-0.349380441	0.01230209
Spy49_1257c	0.317993873	0.310850326	0.314422099	0.00505125
Spy49_1259c	0.456574248	0.49066439	0.473619319	0.02410537
Spy49_1260c	0.904891752	0.840159617	0.872525685	0.04577253
Spy49_1261c	0.629898202	0.644081556	0.636989879	0.01002915
Spy49_1263c	-1.125587362	-1.074620382	-1.100103872	0.0360391
Spy49_1265c	-0.309608116	-0.244737912	-0.277173014	0.04587016
Spy49_1266c	0.201256077	0.229199789	0.215227933	0.01975919
Spy49_1267c	0.248277241	0.302680169	0.275478705	0.03846868
Spy49_1268	0.349930581	0.311636102	0.330783341	0.02707829
Spy49_1269	0.450055385	0.454307309	0.452181347	0.00300656
Spy49_1270	0.560527147	0.576129401	0.568328274	0.01103246
Spy49_1271	0.858472423	0.807139986	0.832806204	0.03629751
Spy49_1272	0.790373198	0.91909672	0.854734959	0.09102127
Spy49_1273	0.663403465	0.675332785	0.669368125	0.0084353

Spy49_1274c	0.212279962	0.185626816	0.198953389	0.01884662
Spy49_1275c	-0.361920704	-0.340127088	-0.351023896	0.01541041
Spy49_1276c	-0.535540404	-0.33850748	-0.437023942	0.13932332
Spy49_1277c	0.496592424	0.511800261	0.504196343	0.01075356
Spy49_1279		-0.230258605	-0.230258605	
Spy49_1280c	-0.502551801	-0.542995926	-0.522773864	0.02859831
Spy49_1281c	-0.354542093		-0.354542093	
Spy49_1282c	-0.211739403	-0.203795656	-0.207767529	0.00561708
Spy49_1285c	-0.84352854	-0.83993839	-0.841733465	0.00253862
Spy49_1286c	0.599994987	0.625761998	0.612878493	0.01822003
Spy49_1287c	0.672932176	0.696661929	0.684797053	0.01677947
Spy49_1289c	0.337719654	0.323818287	0.330768971	0.00982975
Spy49_1290c	-0.442601401	-0.409049591	-0.425825496	0.02372471
Spy49_1291c	-0.213858877	-0.233307799	-0.223583338	0.01375246
Spy49_1294c	-0.305214695	-0.112382271	-0.208798483	0.13635311
Spy49_1295c	0.286743967	0.275927813	0.28133589	0.00764818
Spy49_1296c	0.158501195	0.182170291	0.170335743	0.01673658
Spy49_1297c	-0.313376704	-0.246962802	-0.280169753	0.04696172
Spy49_1298c	-0.264302578	-0.217136395	-0.240719487	0.03335153
Spy49_1299c	-0.207955929	-0.166014813	-0.186985371	0.02965685
Spy49_1300c	-0.408906272	-0.409195287	-0.40905078	0.00020436
Spy49_1304c	0.257708979	0.237072702	0.247390841	0.01459205
Spy49_1308c	-0.656465343	-0.729225324	-0.692845333	0.05144908
Spy49_1312c		0.189567017	0.189567017	
Spy49_1313c	0.318973201	0.270150473	0.294561837	0.03452288
Spy49_1314c	1.281578735	1.251666867	1.266622801	0.02115088
Spy49_1316c	0.518026254	0.56704918	0.542537717	0.03466444
Spy49_1318c	1.100831219	1.119404255	1.110117737	0.01313312
Spy49_1319	0.369846909	0.328785349	0.349316129	0.02903491
Spy49_1320c	-1.55910107	-1.503693719	-1.531397395	0.03917891
Spy49_1321c	-1.678028624	-1.716394823	-1.697211723	0.027129
Spy49_1322c	-2.079479254	-2.067952552	-2.073715903	0.00815061
Spy49_1323c	-2.10241979	-2.083974774	-2.093197282	0.0130426
Spy49_1324c	-2.085405518	-2.084774549	-2.085090033	0.00044616
Spy49_1325c	-1.812248315	-1.798994689	-1.805621502	0.00937173
Spy49_1326c	-1.734057423	-1.764711242	-1.749384333	0.02167552
Spy49_1327c	-1.544725585	-1.54717306	-1.545949322	0.00173063
Spy49_1328c	-1.261132221	-1.210611923	-1.235872072	0.03572325
Spy49_1329c	-0.85327919	-0.844133973	-0.848706582	0.00646665
Spy49_1330	-1.403106699	-1.36497577	-1.384041234	0.02696264
Spy49_1331c	0.973950797	0.983011968	0.978481382	0.00640722
Spy49_1332c	2.181635947	2.178389038	2.180012493	0.00229591
Spy49_1334c	1.862257366	1.870905828	1.866581597	0.00611539
Spy49_1335	0.551024446	0.541561723	0.546293084	0.00669116
Spy49_1336c	-0.358611412	-0.403477593	-0.381044503	0.03172518
Spy49_1342c	-1.24620862	-1.280852709	-1.263530664	0.02449707
Spy49_1343c	-0.957178841	-0.966903437	-0.962041139	0.00687633
Spy49_1344c	-0.791561385	-0.784690244	-0.788125814	0.00485863
Spy49_1345c	-0.647258873	-0.610625705	-0.628942289	0.02590356
Spy49_1348c	-0.160160702		-0.160160702	
Spy49_1349c	-0.162315366	-0.126021447	-0.144168406	0.02566368
Spy49_1350c	-0.19281417	-0.33238038	-0.262597275	0.09868821
Spy49_1353	-0.30141264	-0.244620532	-0.273016586	0.04015808
Spy49_1357	-0.362934618	-0.481187738	-0.422061178	0.08361758
Spy49_1358	-0.464947161	-0.438328413	-0.451637787	0.0188223
Spy49_1362c	-0.298707695	-0.334699497	-0.316703596	0.02545005

Spy49_1363c	-0.544602301	-0.525143286	-0.534872793	0.0137596
Spy49_1364c	-0.57479122	-0.59611899	-0.585455105	0.01508101
Spy49_1366c	-1.052537621	-1.074793673	-1.063665647	0.01573741
Spy49_1367c	-1.007346438	-0.988810166	-0.998078302	0.01310712
Spy49_1368c	-1.477239376	-1.542697256	-1.509968316	0.04628571
Spy49_1369c	-1.205735691	-1.231439597	-1.218587644	0.01817541
Spy49_1370c	-1.003626485	-1.01146272	-1.007544603	0.00554105
Spy49_1371c	-1.053419658	-1.050447227	-1.051933442	0.00210183
Spy49_1372c	0.642274221	0.668629108	0.655451665	0.01863572
Spy49_1373	1.128779057	1.225312323	1.17704569	0.06825933
Spy49_1374c	1.611102392	1.500392229	1.555747311	0.07828391
Spy49_1375c	2.208893959	2.246436971	2.227665465	0.02654692
Spy49_1376c	2.437325762	2.467259914	2.452292838	0.02116664
Spy49_1377c	0.387233818	0.402106554	0.394670186	0.01051661
Spy49_1378c	0.521127243	0.535418174	0.528272708	0.01010521
Spy49_1379c	0.485614365	0.511690979	0.498652672	0.01843895
Spy49_1380c	0.658592464	0.716233956	0.68741321	0.04075869
Spy49_1382c	0.520690772	0.553481616	0.537086194	0.02318663
Spy49_1383c	0.896508784	0.918962129	0.907735457	0.01587691
Spy49_1384c	1.177071822	1.204652332	1.190862077	0.01950237
Spy49_1385c	0.886422943	0.705721046	0.796071994	0.12777554
Spy49_1386c	0.730160304		0.730160304	
Spy49_1387c	0.627586855	0.651804028	0.639695442	0.01712413
Spy49_1388c	0.871746914	0.823869417	0.847808165	0.0338545
Spy49_1390c	0.427058703	0.436561004	0.431809853	0.00671914
Spy49_1391	0.460320989	0.528742832	0.49453191	0.04838155
Spy49_1392c	-0.552379432	-0.600345122	-0.576362277	0.03391686
Spy49_1393c		-0.277704153	-0.277704153	
Spy49_1394c	-0.436026734	-0.389714267	-0.4128705	0.03274786
Spy49_1395c	0.282732525	0.271123718	0.276928122	0.00820867
Spy49_1396c	0.305996428	0.29417772	0.300087074	0.00835709
Spy49_1397c	0.539091695	0.518868658	0.528980176	0.01429985
Spy49_1398c	0.459823349	0.436231147	0.448027248	0.01668221
Spy49_1400c	-0.492893001	-0.50617304	-0.49953302	0.00939041
Spy49_1401c	-0.308831483	-0.300131458	-0.304481471	0.00615185
Spy49_1402c	-0.171036666	-0.213847931	-0.192442299	0.03027214
Spy49_1403c	-0.253197109	-0.212398135	-0.232797622	0.02884923
Spy49_1405c	-0.506779844	-0.503658716	-0.50521928	0.00220697
Spy49_1407c	0.33902436	0.266726823	0.302875591	0.05112208
Spy49_1409c	-0.190207877	-0.161514178	-0.175861028	0.02028951
Spy49_1410c	0.295815871	0.296985462	0.296400667	0.00082703
Spy49_1412c	0.574105675	0.561798867	0.567952271	0.00870223
Spy49_1413c	0.748372865	0.777781846	0.763077356	0.02079529
Spy49_1414c	0.917111534	0.906004932	0.911560136	0.00785624
Spy49_1415c	1.553858454	1.550990276	1.552424365	0.00202811
Spy49_1416	1.670817771	1.997780908	1.834299339	0.23119785
Spy49_1417	1.964055154	1.963093202	1.963574178	0.0006802
Spy49_1418c	-0.720306137	-0.689436579	-0.704871358	0.02182807
Spy49_1420c	-0.431761687	-0.468230459	-0.449996073	0.02578732
Spy49_1421c	0.122820062	0.162115659	0.14246786	0.02778618
Spy49_1423c	0.644777282	0.664065263	0.654421272	0.01363866
Spy49_1424		0.415627693	0.415627693	
Spy49_1426c	0.253293822	0.313740521	0.283517172	0.04274227
Spy49_1427c	0.405748006	0.409448724	0.407598365	0.0026168
Spy49_1428c	0.345616084	0.31779295	0.331704517	0.01967393
Spy49_1429c	0.986442319	0.936730269	0.961586294	0.03515173

Spy49_1430	0.467920698	0.526799492	0.497360095	0.04163359
Spy49_1432c	-0.391052353	-0.363013367	-0.37703286	0.01982656
Spy49_1435c	0.358879293	0.445135628	0.40200746	0.06099244
Spy49_1436c	0.685249373	0.751090466	0.718169919	0.04655668
Spy49_1437	0.247935046	0.243930546	0.245932796	0.00283161
Spy49_1438	-0.616379154	-0.619734054	-0.618056604	0.00237227
Spy49_1439	-0.59990656	-0.596406232	-0.598156396	0.00247511
Spy49_1440	-0.538072751	-0.536382891	-0.537227821	0.00119491
Spy49_1441c	1.408327798	1.40064886	1.404488329	0.00542983
Spy49_1442	-1.021028939	-1.013345339	-1.017187139	0.00543313
Spy49_1443c	1.168430365	1.161463355	1.16494686	0.00492642
Spy49_1444c	1.651826111	1.625873817	1.638849964	0.01835104
Spy49_1447c	-0.206693105	-0.172113288	-0.189403196	0.02445162
Spy49_1450	-0.316106691	-0.335835826	-0.325971258	0.01395061
Spy49_1451	-0.212032002	-0.209064893	-0.210548448	0.00209806
Spy49_1453	0.435345681	0.501078331	0.468212006	0.04648
Spy49_1485c		0.370890078	0.370890078	
Spy49_1500c	0.637590679	0.609358119	0.623474399	0.01996343
Spy49_1501c	0.253033928		0.253033928	
Spy49_1506c	-0.236079022	-0.251146202	-0.243612612	0.0106541
Spy49_1533c	0.333474342	0.384019073	0.358746707	0.03574052
Spy49_1535c	0.262707719	0.283196747	0.272952233	0.01448793
Spy49_1536c	0.701237907	0.734254822	0.717746364	0.02334648
Spy49_1537c	0.498461971	0.574354315	0.536408143	0.05366399
Spy49_1538	0.69214756	0.616537717	0.654342638	0.05346423
Spy49_1540c	-0.547996597	-0.553134963	-0.55056578	0.00363337
Spy49_1541c	-0.695226398	-0.738648526	-0.716937462	0.03070408
Spy49_1542c	-0.961634366	-0.961608957	-0.961621662	1.7967E-05
Spy49_1547c	0.23501258	0.264949634	0.249981107	0.02116869
Spy49_1548	0.236227842	0.204470044	0.220348943	0.02245615
Spy49_1550c	-0.412518701	-0.38676041	-0.399639555	0.01821386
Spy49_1552c	0.370449331	0.428908301	0.399678816	0.04133673
Spy49_1553c	-0.23151941	-0.224267901	-0.227893655	0.00512759
Spy49_1554c	-0.363273142	-0.312437716	-0.337855429	0.03594607
Spy49_1555c	0.212249576	0.209978816	0.211114196	0.00160567
Spy49_1558c	-1.12955801	-1.168540504	-1.149049257	0.02756479
Spy49_1559c	0.969532837	1.017149771	0.993341304	0.03367026
Spy49_1560c	0.155530869	0.149559581	0.152545225	0.00422234
Spy49_1562c	0.369378593	0.404293553	0.386836073	0.0246886
Spy49_1563c	-0.300644114	-0.261401433	-0.281022774	0.02774877
Spy49_1564	0.501660583	0.608229778	0.554945181	0.0753558
Spy49_1565c	0.382489194	0.403663768	0.393076481	0.01497268
Spy49_1566c	0.48588172	0.514600411	0.500241065	0.02030718
Spy49_1567c	0.78586178	0.772789778	0.779325779	0.0092433
Spy49_1568c	0.573094104	0.52817331	0.550633707	0.0317638
Spy49_1569c	-1.044925003	-1.121266309	-1.083095656	0.05398145
Spy49_1571c		0.12860936	0.12860936	
Spy49_1573	0.220763317	0.220277695	0.220520506	0.00034339
Spy49_1574	0.373957846	0.364395376	0.369176611	0.00676169
Spy49_1575c	-1.340284641	-1.384321737	-1.362303189	0.03113893
Spy49_1576c	-1.206474691	-1.226312211	-1.216393451	0.01402724
Spy49_1577c	-1.707796298	-1.673639637	-1.690717967	0.02415241
Spy49_1578c	-2.56556647	-2.685355105	-2.625460787	0.08470336
Spy49_1579c	-3.581297371	-3.952569896	-3.766933634	0.26252932
Spy49_1580c	-3.518267599	-4.580674697	-4.049471148	0.75123526
Spy49_1582c	-3.367901075	-4.569727431	-3.968814253	0.84981957

Spy49_1583c	-5.749479294	-5.706334552	-5.727906923	0.03050794
Spy49_1584c	-5.797574067	-5.880294804	-5.838934435	0.05849239
Spy49_1585c	-4.938664485	-4.979373883	-4.959019184	0.02878589
Spy49_1586c	-4.585947525	-4.56331057	-4.574629048	0.01600674
Spy49_1587c	-4.257989463	-4.421651903	-4.339820683	0.11572682
Spy49_1588c	-3.503295047	-3.641813273	-3.57255416	0.09794718
Spy49_1589c	-2.704097304	-2.660582752	-2.682340028	0.03076943
Spy49_1590c	-2.624629903	-2.664998523	-2.644814213	0.02854493
Spy49_1591	-1.375398705	-1.303375363	-1.339387034	0.05092819
Spy49_1592	-0.326492019	-0.348441499	-0.337466759	0.01552063
Spy49_1593	-0.448894398	-0.323822091	-0.386358245	0.08843948
Spy49_1595c	-0.172010976		-0.172010976	
Spy49_1598c	-0.473363624	-0.427504912	-0.450434268	0.03242701
Spy49_1599c	-0.196128458	-0.192174087	-0.194151273	0.00279616
Spy49_1602c	-1.000579631	-1.018861171	-1.009720401	0.012927
Spy49_1603c	-0.478947997	-0.457203847	-0.468075922	0.01537544
Spy49_1604c	-0.497865144	-0.533179376	-0.51552226	0.02497093
Spy49_1605c	-0.91216605	-1.132137552	-1.022151801	0.15554334
Spy49_1606c	-0.515615475	-0.460593176	-0.488104326	0.03890664
Spy49_1607c	-0.386190482	-0.380589715	-0.383390098	0.00396034
Spy49_1608c	-0.421408922	-0.397373867	-0.409391394	0.01699535
Spy49_1609c	1.025217786	1.046100701	1.035659243	0.01476645
Spy49_1610c	1.009479969	0.963611802	0.986545885	0.03243369
Spy49_1611c	0.664426588	0.694220703	0.679323645	0.02106762
Spy49_1612c	0.617254938	0.556921209	0.587088073	0.04266239
Spy49_1613c	-0.295152533	-0.293098754	-0.294125644	0.00145224
Spy49_1616c	-0.276764515	-0.280301431	-0.278532973	0.00250098
Spy49_1617c	0.33635195	0.359394437	0.347873193	0.0162935
Spy49_1618c	0.268985136	0.319126086	0.294055611	0.03545501
Spy49_1619c	-0.377738242	-0.398491568	-0.388114905	0.01467482
Spy49_1620c	-0.326003544	-0.310057022	-0.318030283	0.01127589
Spy49_1621c	-0.182078227	-0.21092432	-0.196501274	0.02039727
Spy49_1624c	-0.513390688	-0.461743324	-0.487567006	0.0365202
Spy49_1629c		0.230817965	0.230817965	
Spy49_1630	0.731623631	0.717057685	0.724340658	0.01029968
Spy49_1632c		0.245550059	0.245550059	
Spy49_1633c	-3.349637456	-3.391686484	-3.37066197	0.02973315
Spy49_1634	0.451932602	0.463781678	0.45785714	0.00837856
Spy49_1635c	0.561673173	0.629012244	0.595342708	0.04761591
Spy49_1636c	0.906887364	0.9266667	0.916777032	0.0139861
Spy49_1637c	-0.615510182	-0.569582473	-0.592546328	0.03247579
Spy49_1638c	-0.542577909	-0.552431571	-0.54750474	0.00696759
Spy49_1639c	-0.622466084	-0.60814952	-0.615307802	0.01012334
Spy49_1643c		-0.216558791	-0.216558791	
Spy49_1644c	0.299381476	0.291259109	0.295320292	0.00574338
Spy49_1646c		0.253103658		
Spy49_1647c		0.52936061		
Spy49_1649c	-0.625865215	-0.769804993	-0.697835104	0.10178079
Spy49_1651	-0.538965992	-0.441700186	-0.490333089	0.06877731
Spy49_1653	0.660746934	0.681469326	0.67110813	0.01465294
Spy49_1654	0.732301592	0.762538809	0.7474202	0.02138094
Spy49_1655	0.860611425	0.938401203	0.899506314	0.05500568
Spy49_1658c	-0.804873167	-0.642922499	-0.723897833	0.11451642
Spy49_1659c	-0.38075438	-0.359593135	-0.370173757	0.01496326
Spy49_1660	-0.773877277	-0.816754596	-0.795315936	0.03031884
Spy49_1661	-0.620697318	-0.633928779	-0.627313048	0.00935606

Spy49_1662	-0.408938327	-0.484484749	-0.446711538	0.05341939
Spy49_1663	-0.241060857	-0.250301299	-0.245681078	0.00653398
Spy49_1664	-0.693744573	-0.583231768	-0.638488171	0.07814435
Spy49_1665c	-0.437147184	-0.44794666	-0.442546922	0.00763638
Spy49_1666c	-1.444683497	-1.418654559	-1.431669028	0.01840524
Spy49_1667c	-1.467574355	-1.383277786	-1.42542607	0.05960668
Spy49_1668c	-3.774735939	-3.893208322	-3.83397213	0.08377263
Spy49_1669c	-0.488732477	-0.572578595	-0.530655536	0.05928816
Spy49_1669c	-0.488732477	-0.572578595	-0.530655536	0.05928816
Spy49_1670c	-2.860655281	-2.863612618	-2.86213395	0.00209115
Spy49_1671c	-4.454833907	-4.510935786	-4.482884846	0.03967002
Spy49_1672c	-2.785273348	-2.757316344	-2.771294846	0.01976859
Spy49_1673c	-1.578337219	-1.812479948	-1.695408584	0.16556391
Spy49_1675c	0.539096758	0.584918931	0.562007845	0.03240117
Spy49_1676c	0.557295288	0.543595854	0.550445571	0.00968696
Spy49_1677c	0.520742158	0.518924639	0.519833399	0.00128518
Spy49_1678c	0.290503791	0.297545604	0.294024698	0.00497931
Spy49_1679c	0.302379302	0.337873076	0.320126189	0.02509789
Spy49_1680c	0.227483191	0.305624116	0.266553654	0.05525398
Spy49_1681c	-0.730587964	-0.662132657	-0.69636031	0.04840521
Spy49_1682c	0.945373003	1.021675366	0.983524184	0.05395392
Spy49_1683c	-2.965585017	-3.057112651	-3.011348834	0.06471981
Spy49_1684c	-2.535721789	-3.025350795	-2.780536292	0.34621999
Spy49_1686	-1.731915701	-2.301203247	-2.016559474	0.40254708
Spy49_1687c	-3.181474231	-3.146686663	-3.164080447	0.02459853
Spy49_1688c	-3.066827661	-3.084977739	-3.0759027	0.01283404
Spy49_1689c	-2.998675359	-3.085400181	-3.04203777	0.06132371
Spy49_1690c	-2.78888592	-2.871886535	-2.830386228	0.0586903
Spy49_1693	-0.735973978	-0.885740528	-0.810857253	0.10590094
Spy49_1694	1.073679864	1.098193689	1.085936776	0.01733389
Spy49_1695c	0.727109443	0.778381521	0.752745482	0.03625483
Spy49_1696c	0.784862246	0.794204235	0.789533241	0.00660578
Spy49_1697c	0.404443871	0.524099492	0.464271682	0.0846093
Spy49_1698c	0.709640546	0.681135909	0.695388228	0.02015582
Spy49_1699c	0.235468638	0.305776437	0.270622538	0.04971512
Spy49_1701c	0.378158342	0.39884494	0.388501641	0.01462763
Spy49_1702c	0.586877321	0.634987783	0.610932552	0.03401923
Spy49_1704c	0.363099403	0.328492749	0.345796076	0.0244706
Spy49_1705c	0.411179122	0.422414295	0.416796709	0.00794447
Spy49_1705c	0.411179122	0.422414295	0.416796709	0.00794447
Spy49_1705c	0.411179122	0.422414295	0.416796709	0.00794447
Spy49_1706c	0.197838223	0.213006283	0.205422253	0.01072544
Spy49_1708	0.504807181	0.428933807	0.466870494	0.05365058
Spy49_1709	0.392083605	0.516653625	0.454368615	0.08808431
Spy49_1713	0.541054055	0.520169871	0.530611963	0.01476735
Spy49_1714c	0.262498826	0.280797193	0.27164801	0.0129389
Spy49_1715c	0.557151159	0.521339649	0.539245404	0.02532256
Spy49_1716c	0.899320898	0.877301991	0.888311445	0.01556972
Spy49_1717c	0.325314566	0.392368095	0.35884133	0.04741401
Spy49_1719c	-1.900779495	-1.797276126	-1.849027811	0.07318793
Spy49_1720c	0.5699596	0.654927385	0.612443493	0.0600813
Spy49_1721	0.172589153	0.148986542	0.160787848	0.01668957
Spy49_1722	0.428040418	0.420075744	0.424058081	0.00563187
Spy49_1725	0.258266243	0.250895499	0.254580871	0.0052119
Spy49_1726	0.270979172	0.314217848	0.29259851	0.03057436
Spy49_1727	0.20986506	0.286814924	0.248339992	0.05441177

Spy49_1728	0.320552955	0.303917721	0.312235338	0.01176289
Spy49_1729	0.339741822	0.31760647	0.328674146	0.01565206
Spy49_1730	0.32092363	0.277922636	0.299423133	0.03040629
Spy49_1731	0.384995927	0.387310921	0.386153424	0.00163695
Spy49_1732c	0.671851227	0.691258731	0.681554979	0.01372318
Spy49_1733	0.472644978	0.515160576	0.493902777	0.03006307
Spy49_1735c	-0.647213368	-0.647054732	-0.64713405	0.00011217
Spy49_1736c	-0.626849808	-0.578799049	-0.602824429	0.03397702
Spy49_1740	0.527307695	0.72019466	0.623751177	0.13639168
Spy49_1742	0.82980224	0.783591593	0.806696917	0.03267586
Spy49_1743c	-0.502424809	-0.417040517	-0.459732663	0.06037581
Spy49_1744c	-0.346257534	-0.335876062	-0.341066798	0.00734081
Spy49_1745c	-0.277609538	-0.228361634	-0.252985586	0.03482353
Spy49_1747c	0.523961941	0.554955385	0.539458663	0.02191567
Spy49_1748c	-0.310977209		-0.310977209	
Spy49_1749c	-0.991521665	-0.922095524	-0.956808594	0.04909169
Spy49_1750c	-0.420648396	-0.462589917	-0.441619157	0.02965713
Spy49_1751c	-0.504675709	-0.49348082	-0.499078265	0.00791598
Spy49_1752c	-0.590804153	-0.487377886	-0.539091019	0.07313341
Spy49_1752c	-0.590804153	-0.487377886	-0.539091019	0.07313341
Spy49_1753c	-0.565588695	-0.580661481	-0.573125088	0.01065807
Spy49_1754c	0.300411473	0.300161454	0.300286464	0.00017679
Spy49_1761c	1.053502375	1.052279548	1.052890962	0.00086467
Spy49_1762	-0.175171605		-0.175171605	
Spy49_1763	-0.352424983	-0.342493873	-0.347459428	0.00702236
Spy49_1765c	0.528487805	0.556566161	0.542526983	0.0198544
Spy49_1767c	-0.176108012	-0.177505043	-0.176806528	0.00098785
Spy49_1769c	0.360696325	0.385992654	0.37334449	0.01788721
Spy49_1770	-0.414446883	-0.35058143	-0.382514157	0.0451597
Spy49_1775	0.267627241		0.267627241	
Spy49_1777	0.31450686		0.31450686	
Spy49_1778	0.367188536	0.315438475	0.341313506	0.03659282
Spy49_1779	0.195973177	0.110880089	0.153426633	0.0601699
Spy49_1780c	0.651852694	0.687195543	0.669524119	0.02499117
Spy49_1781	1.173462637	1.333808973	1.253635805	0.11338198
Spy49_1782	1.654088574	1.709920255	1.682004415	0.03947896
Spy49_1783	1.132919496	1.181608598	1.157264047	0.03442839
Spy49_1784c	0.190915061	0.483137309	0.337026185	0.20663233
Spy49_1785	0.408269041		0.408269041	
Spy49_1786c	0.452001261	0.545956412	0.498978837	0.06643632
Spy49_1787c	-0.800410993	-0.726934076	-0.763672535	0.05195603
Spy49_1788c	-0.549831295	-0.577750554	-0.563790925	0.0197419
Spy49_1789c	-0.590673488	-0.51678532	-0.553729404	0.05224682
Spy49_1790c	-1.021376532	-1.035693369	-1.02853495	0.01012353
Spy49_1791c	-0.731641007	-0.725268076	-0.728454542	0.00450634
Spy49_1793c	0.366921747	0.41557145	0.391246599	0.03440053
Spy49_1794	-0.845665071	-0.828803298	-0.837234184	0.01192307
Spy49_1795	-1.120641247	-1.081830715	-1.101235981	0.02744319
Spy49_1796c	1.018185559	1.061030987	1.039608273	0.03029629
Spy49_1797c	-0.64947723	-0.516987781	-0.583232505	0.09368419
Spy49_1798c	-0.966996581	-0.911963109	-0.939479845	0.03891454
Spy49_1798c	-0.966996581	-0.911963109	-0.939479845	0.03891454
Spy49_1800c	-0.996541252	-1.010727357	-1.003634304	0.01003109
Spy49_1801c	-1.222788984	-1.198239852	-1.210514418	0.01735886
Spy49_1802c	-0.84656047	-1.030187033	-0.938373751	0.12984359
Spy49_1808	0.218697114	0.240565291	0.229631203	0.01546314

Spy49_1809	0.329983272	0.396858961	0.363421117	0.04728825
Spy49_1810	0.602518927	0.627692744	0.615105836	0.01780058
Spy49_1811c	-0.368382164	-0.361287643	-0.364834903	0.00501658
Spy49_1812c	-0.217745651		-0.217745651	
Spy49_1813c	-0.791434858	-0.696941406	-0.744188132	0.06681696
Spy49_1814	-0.369132985	-0.34879794	-0.358965463	0.01437905
Spy49_1815	-0.347494337	-0.357099279	-0.352296808	0.00679172
Spy49_1817	-0.487932363	-0.571206723	-0.529569543	0.05888386
Spy49_1820c	-0.293898846	-0.309251639	-0.301575242	0.01085606
Spy49_1821	-0.363388657	-0.331903867	-0.347646262	0.02226311
Spy49_1822	-0.563619914	-0.500042272	-0.531831093	0.04495618
